



IFW

In re Application of: Matsuzaki et al.	
	Art Unit: [to be assigned]
Application No.: 10/790,224	Examiner: [to be assigned]
Filing Date: March 2, 2004	Atty. Docket: US-162
Title: Method for Producing L-Arginine or L-Lysine by Fermentation	

**CLAIM FOR PRIORITY UNDER 35 U.S.C. § 119 IN UTILITY APPLICATION**

Commissioner of Patents  
P.O. Box 1450  
Alexandria, VA 22313-1450


Sir:

Priority under 35 U.S.C. § 119 is hereby claimed to the following priority document(s), filed in a foreign country within one (1) year prior to the filing of the above-referenced United States utility patent application (35 U.S.C. § 172):

Country	Priority Document Appl. No.	Filing Date
Japan	2003-056129	March 3, 2003

A certified copy of the listed priority document and a translation of the front page is submitted herewith. Prompt acknowledgment of this claim and submission is respectfully requested.

Respectfully submitted,

  
Shelly Guest Cermak  
Reg. No. 39,571

Date: August 27, 2004  
PTO Customer Number: **000038108**  
Ajinomoto U.S.A., Inc.  
1120 Connecticut Avenue, Ste. 1010  
Washington, D.C. 20036  
202.457.0284  
202.457.0107 (fax)

日本国特許庁  
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日 2003年 3月 3日  
Date of Application:

出願番号 特願2003-056129  
Application Number:

[ST. 10/C]: [JP 2003-056129]

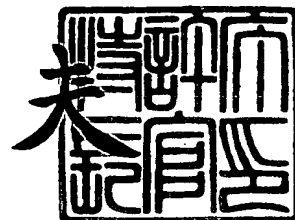
願 人 味の素株式会社  
Applicant(s):

CERTIFIED COPY OF  
PRIORITY DOCUMENT

2004年 1月 9日

特許庁長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

今井 康夫



【書類名】 特許願

【整理番号】 P-B0580

【提出日】 平成15年 3月 3日

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 C12P 13/06

【発明の名称】 発酵法による L-アルギニン又は L-リジンの製造法

【請求項の数】 9

【発明者】

    【住所又は居所】 神奈川県川崎市川崎区鈴木町 1 - 1 味の素株式会社内

    【氏名】 松崎 友美

【発明者】

    【住所又は居所】 神奈川県川崎市川崎区鈴木町 1 - 1 味の素株式会社内

    【氏名】 中村 純

【発明者】

    【住所又は居所】 神奈川県川崎市川崎区鈴木町 1 - 1 味の素株式会社内

    【氏名】 橋口 賢一

【特許出願人】

    【識別番号】 000000066

    【氏名又は名称】 味の素株式会社

【代理人】

    【識別番号】 100100549

    【弁理士】

    【氏名又は名称】 川口 嘉之

【選任した代理人】

    【識別番号】 100090516

    【弁理士】

    【氏名又は名称】 松倉 秀実

## 【選任した代理人】

【識別番号】 100089244

【弁理士】

【氏名又は名称】 遠山 勉

## 【手数料の表示】

【予納台帳番号】 192372

【納付金額】 21,000円

## 【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 発酵法による L-アルギニン又は L-リジンの製造法

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 L-アルギニン又は L-リジン生産能を有し、かつ、細胞内のグルタミンシンテターゼ活性が増強されるように改変されたコリネ型細菌。

【請求項 2】 グルタミンシンテターゼのアデニリル化による活性調節が解除されるように改変されたことを特徴とする請求項 1 に記載のコリネ型細菌。

【請求項 3】 グルタミンシンテターゼのアデニリル化による活性調節の解除が、アデニリル化による活性調節が解除されたグルタミンシンテターゼを保持すること、細胞内のグルタミンシンテターゼ・アデニリルトランスフェラーゼ活性が低下したこと、細胞内のPIIたんぱく質活性が低下したこと、又は、窒素代謝制御たんぱく質を細胞内のグルタミンシンテターゼ活性が上昇するように改変することのいずれか 1 つ又は 2 つ以上によるものである請求項 2 に記載の細菌。

【請求項 4】 染色体上のグルタミンシンテターゼ・アデニリルトランスフェラーゼをコードする遺伝子が破壊されたことを特徴とする請求項 3 に記載のコリネ型細菌。

【請求項 5】 窒素代謝制御たんぱく質が amtR 遺伝子産物であり、同遺伝子産物が正常に機能しないことによりグルタミンシンテターゼ活性が上昇した請求項 3 に記載のコリネ型細菌。

【請求項 6】 染色体上の amtR 遺伝子が破壊されたことを特徴とする請求項 5 に記載のコリネ型細菌。

【請求項 7】 アルギニンリプレッサーが正常に機能しないように改変された請求項 1 ～ 6 のいずれか一項に記載のコリネ型細菌。

【請求項 8】 染色体上のアルギニンリプレッサーをコードする遺伝子が破壊されたことを特徴とする請求項 7 に記載のコリネ型細菌。

【請求項 9】 請求項 1 ～ 8 のいずれか一項に記載のコリネ型細菌を培地に培養し、該培地中に L-アルギニン又は L-リジンを生成蓄積させ、同培地から L-アルギニン又は L-リジンを採取することを特徴とする L-アルギニン又は L-リジンの製造法。

**【発明の詳細な説明】****【0001】****【発明の属する技術分野】**

本発明は、コリネ型細菌によるL-アミノ酸の製造法、特に、L-アルギニン及びL-リジンの製造法に関する。L-アルギニンは、肝機能促進薬、アミノ酸輸液及び総合アミノ酸製剤等の成分として、L-リジンは動物飼料用の添加物、健康食品の成分、アミノ酸輸液として産業上有用なアミノ酸である。

**【0002】****【従来の技術】**

発酵法によってL-アミノ酸を製造するには、微生物の育種改良法が多用されてきた。すなわち、野生株そのもののL-アミノ酸生産の生産能は極めて低い場合が多いので、突然変異により栄養要求性、アナログ耐性、もしくは代謝調節変異を付与したり、又はこれらを組み合わせる方法が知られている。上述の方法によれば、それなりの収量でL-アミノ酸は得られるが、工業的に安価にL-アミノ酸を製造する為には、さらに発酵収率を向上させることが不可欠である。

**【0003】**

発酵収率を向上させるためには、アミノ酸生合成経路の酵素活性を至適に調節させる事、即ち炭素源からアミノ酸に至る生合成系を強化する事が好ましいと考えられる。

**【0004】**

塩基性アミノ酸は特に窒素含量が高く、アミノ酸1分子当たり、アルギニンは炭素分子6分子、窒素分子4分子、リジンは炭素分子6分子、窒素分子2分子から形成されている。

**【0005】**

アミノ酸発酵において、炭素の代謝と同様に窒素の代謝が有効と考えられ、発酵収率を向上させるためには、炭素の代謝と同様に窒素の代謝を改変することが重要であると考えられる。アミノ酸生合成系過程において、窒素分子の付加はグルタミン、グルタミン酸に含まれるアミノ基のアミノ基転移反応により付加される。従って、細胞内のグルタミン、グルタミン酸濃度を上昇させる事が、アミノ

酸の発酵収率向上に繋がると考えられる。

【0006】

グルタミン酸濃度を上昇させる方法として、 $\alpha$ -ケトグルタル酸デヒドロゲナーゼ遺伝子をコードするodhA遺伝子を欠損させる方法（特許文献1）、グルタミン酸濃度を上昇させる方法として、グルタミンシンテターゼをコードする遺伝子glnAを増強する方法（特許文献2、特許文献3）が考えられる。またグルタミンシンテターゼのアデニリル化を解除することがL-グルタミンの供給経路を強化する方法の一つとして効果がある事が開示されている（特許文献2、特許文献3）。しかし、コリネ型細菌において、L-グルタミン又はL-グルタミン酸の生合成の強化がL-アルギニン又はL-リジンの生産性に与える影響については知られていない。

【0007】

【特許文献1】

国際公開第95/34672号パンフレット

【特許文献2】

特開2002-300887号公報

【特許文献3】

欧州特許出願公開第1229121号明細書

【0008】

【発明が解決しようとする課題】

本発明は、コリネ型細菌の窒素代謝を改変する事によって、L-アミノ酸、特にL-アルギニン、L-リジンの発酵収率を向上する事を課題とする。

【0009】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、上記問題点を解決すべく鋭意検討を行った結果、グルタミンシンテターゼのアデニリル化を中心とした窒素代謝制御機構が改変されたコリネ型細菌の菌株が、細胞内のグルタミン、グルタミン酸の濃度が向上されることにより、アミノ酸生産、特にL-アルギニン、L-リジンの塩基性アミノ酸の発酵生産に優れていることを見出した。

## 【0010】

すなわち、本発明は以下のとおりである。

(1) L-アルギニン又はL-リジン生産能を有し、かつ、細胞内のグルタミンシンターゼ活性が増強されるように改変されたコリネ型細菌。

(2) グルタミンシンターゼのアデニリル化による活性調節が解除されるように改変されたことを特徴とする(1)のコリネ型細菌。

(3) グルタミンシンターゼのアデニリル化による活性調節の解除が、アデニリル化による活性調節が解除されたグルタミンシンターゼを保持すること、細胞内のグルタミンシンターゼ・アデニリルトランスフェラーゼ活性が低下したこと、細胞内のPIIたんぱく質活性が低下したこと、又は、窒素代謝制御たんぱく質を細胞内のグルタミンシンターゼ活性が上昇するように改変することのいずれか1つ又は2つ以上によるものである(2)の細菌。

(4) 染色体上のグルタミンシンターゼ・アデニリルトランスフェラーゼをコードする遺伝子が破壊されたことを特徴とする(3)のコリネ型細菌。

(5) 窒素代謝制御たんぱく質がamtR遺伝子産物であり、同遺伝子産物が正常に機能しないことによりグルタミンシンターゼ活性が上昇した(3)のコリネ型細菌。

(6) 染色体上のamtR遺伝子が破壊されたことを特徴とする(5)のコリネ型細菌。

(7) アルギニンリプレッサーが正常に機能しないように改変された(1)～(6)のいずれかのコリネ型細菌。

(8) 染色体上のアルギニンリプレッサーをコードする遺伝子が破壊されたことを特徴とする(7)のコリネ型細菌。

(9) (1)～(8)のいずれかのコリネ型細菌を培地に培養し、該培地中にL-アルギニン又はL-リジンを生成蓄積させ、同培地からL-アルギニン又はL-リジンを採取することを特徴とするL-アルギニン又はL-リジンの製造法。

## 【0011】

## 【発明の実施の形態】

以下、本発明を詳細に説明する。



**【0012】**

＜1＞本発明のコリネ型細菌の構築のために用いられるコリネ型細菌

本発明において、「コリネ型細菌」とは、従来ブレバクテリウム属に分類されていたが、現在コリネバクテリウム属に分類された細菌も含み（Int. J. Syst. Bacteriol., 41, 255(1981)）、またコリネバクテリウム属と非常に近縁なブレバクテリウム属細菌を含む。このようなコリネ型細菌の例として以下のものが挙げられる。

**【0013】**

コリネバクテリウム・アセトアシドフィラム  
コリネバクテリウム・アセトグルタミカム  
コリネバクテリウム・アルカノリティカム  
コリネバクテリウム・カルナエ  
コリネバクテリウム・グルタミカム  
コリネバクテリウム・リリウム  
コリネバクテリウム・メラセコーラ  
コリネバクテリウム・サーモアミノゲネス  
コリネバクテリウム・ハーキュリス  
ブレバクテリウム・ディバリカタム  
ブレバクテリウム・フラバム  
ブレバクテリウム・インマリオフィラム  
ブレバクテリウム・ラクトファーメンタム  
ブレバクテリウム・ロゼウム  
ブレバクテリウム・サッカロリティカム  
ブレバクテリウム・チオゲニタリス  
コリネバクテリウム・アンモニアゲネス  
ブレバクテリウム・アルバム  
ブレバクテリウム・セリヌム  
ミクロバクテリウム・アンモニアフィラス

**【0014】**

具体的には、下記のような菌株を例示することができる。

コリネバクテリウム・アセトアシドフィラム ATCC13870

コリネバクテリウム・アセトグルタミカム ATCC15806

コリネバクテリウム・アルカノリティカム ATCC21511

コリネバクテリウム・カルナエ ATCC15991

コリネバクテリウム・グルタミカム ATCC13020, ATCC13032, ATCC13060

コリネバクテリウム・リリウム ATCC15990

コリネバクテリウム・メラセコーラ ATCC17965

コリネバクテリウム・エッフイシエンス AJ12340(FERM BP-1539)

コリネバクテリウム・ハーキュリス ATCC13868

ブレビバクテリウム・デイバリカタム ATCC14020

ブレビバクテリウム・フラバム ATCC13826, ATCC14067, AJ12418(FERM BP-220

5)

ブレビバクテリウム・インマリオフィラム ATCC14068

ブレビバクテリウム・ラクトファーメンタム ATCC13869

ブレビバクテリウム・ロゼウム ATCC13825

ブレビバクテリウム・サッカロリティカム ATCC14066

ブレビバクテリウム・チオゲニタリス ATCC19240

コリネバクテリウム・アンモニアゲネス ATCC6871、ATCC6872

ブレビバクテリウム・アルバム ATCC15111

ブレビバクテリウム・セリヌム ATCC15112

ミクロバクテリウム・アンモニアフィラス ATCC15354

#### 【0015】

これらを入手するには、例えばアメリカン・タイプ・カルチャー・コレクションより分譲を受けることができる。すなわち、各菌株毎に対応する登録番号が付与されており、この登録番号を利用して分譲を受けることができる。各菌株に対応する登録番号はアメリカン・タイプ・カルチャー・コレクションのカタログに記載されている。また、AJ12340株は、1987年10月27日付けで通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所（現独立行政法人 産業技術総合研究所 特許微生物

寄託センター) (〒305-5466 日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1 中央第6) にFERM BP-1539の受託番号でブダペスト条約に基づいて寄託されている。また、AJ12418株は、1989年1月5日付けで通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所にFERM BP-2205の受託番号でブダペスト条約に基づいて寄託されている。

#### 【0016】

本発明において、「L-アルギニン生産能」とは、本発明のコリネ型細菌を培養したときに、培地中にL-アルギニンを蓄積する能力をいう。このL-アルギニン生産能は、コリネ型細菌の野生株の性質として有するものであってもよく、育種によって付与または増強された性質であってもよい。

#### 【0017】

また、本発明において、「L-リジン生産能」とは、本発明のコリネ型細菌を培養したときに、培地中にL-リジンを蓄積する能力をいう。このL-リジン生産能は、コリネ型細菌の野生株の性質として有するものであってもよく、育種によって付与または増強された性質であってもよい。

#### 【0018】

L-リジン又はL-アルギニン生産能を有するコリネ型細菌は、コリネ型細菌の野生株にL-リジン又はL-アルギニン生産能を付与することにより取得される。L-リジン又はL-アルギニン生産能を付与するには、栄養要求性変異株、アナログ耐性株、又は代謝制御変異株の取得、L-リジン又はL-アルギニンの生合成系酵素が増強された組換え株の創製等、従来、コリネ型細菌又はエシェリヒア属細菌等の育種に採用されてきた方法を適用することができる(アミノ酸発酵、(株)学会出版センター、1986年5月30日初版発行、第77~100頁参照)。L-リジン又はL-アルギニン生産菌の育種において、付与される栄養要求性、アナログ耐性、代謝制御変異等の性質は、単独でもよく、2種又は3種以上であってもよい。また、増強されるL-アミノ酸生合成系酵素も、単独であっても、2種又は3種以上であってもよい。さらに、栄養要求性、アナログ耐性、代謝制御変異等の性質の付与と、生合成系酵素の増強が組み合わせられてもよい。

#### 【0019】

L-アルギニン生産能を有するコリネ型細菌としては、L-アルギニン生産能を有するものであれば特に制限されないが、コリネ型細菌野生株；サルファ剤、2-チアゾールアラニン又は $\alpha$ -アミノ- $\beta$ -ヒドロキシ吉草酸等の薬剤に耐性を有するコリネ型細菌；2-チアゾールアラニン耐性に加えて、L-ヒスチジン、L-プロリン、L-スレオニン、L-イソロイシン、L-メチオニンまたはL-トリプトファン要求性を有するコリネ型細菌（特開昭54-44096号）；ケトマロン酸、フルオロマロン酸又はモノフルオロ酢酸に耐性を有するコリネ型細菌（特開昭57-18989号）；アルギニノールに耐性を有するコリネ型細菌（特開昭62-24075号）；または、X-グアニジン（Xは脂肪酸又は脂肪鎖の誘導体）に耐性を有するコリネ型細菌（特開平2-186995号）等が挙げられる。

#### 【0020】

また、L-アルギニン生産能を有するコリネ型細菌は、5-アザウラシル、6-アザウラシル、2-チオウラシル、5-フルオロウラシル、5-ブロモウラシル、5-アザシトシン、6-アザシトシン等に耐性な変異株；アルギニンヒドロキサメート、2-チオウラシルに耐性な変異株、アルギニンヒドロキサメート及び6-アザウラシルに耐性な変異株（特開昭49-126819号）；ヒスチジンアナログ又はトリプトファンアナログに耐性な変異株（特開昭52-114092号）、メチオン、ヒスチジン、スレオニン、プロリン、イソロイシニン、リジン、アデニン、グアニンまたはウラシル（またはウラシル前駆体）の少なくとも一つに要求性を有する変異株（特開昭52-99289号参）；アルギニンヒドロキサメートに耐性な変異株（特公昭51-6754号）；コハク酸要求性又は核酸塩基アナログに耐性な変異株（特開昭58-9692号）；アルギニン分解能を欠損し、アルギニンのアンタゴニスト及びカナバニンに耐性を有し、リジンを要求する変異株（特開昭52-8729号）；アルギニン、アルギニンヒドロキサメート、ホモアルギニン、D-アルギニン、カナバニン耐性、アルギニンヒドロキサメート及び6-アザウラシル耐性の変異株（特開昭53-143288号）；及び、カナバニン耐性の変異株（特開昭53-3586号）等として育種することができる。

L-アルギニン生産能を有するコリネ型細菌の具体例としては、下記のような

菌株が挙げられる。

【 0 0 2 1 】

ブレビバクテリウム・フラバムAJ11169 (FERM P-4161)

ブレビバクテリウム・ラクトファーメントムAJ12092 (FERM P-7273)

ブレビバクテリウム・フラバムAJ11336 (FERM P-4939)

ブレビバクテリウム・フラバムAJ11345 (FERM P-4948)

ブレビバクテリウム・ラクトファーメントムAJ12430 (FERM BP-2228)

【 0 0 2 2 】

AJ11169株及びAJ12092株は特開昭 5 4 - 4 4 0 9 6 号記載の 2 - チアゾールアラニン耐性株、AJ11336株は特公昭 6 2 - 2 4 0 7 5 号記載のアルギニノール耐性及びサルファダイアジン耐性を有する株、AJ11345株は特公昭 6 2 - 2 4 0 7 5 号記載のアルギニノール耐性、2 - チアゾールアラニン耐性、サルファグアニジン耐性、及びヒスチジン要求性を有する株、及びAJ12430株は特開平 2 - 1 8 6 9 9 5 号記載のオクチルグアニジン耐性及び 2 - チアゾールアラニン耐性を有する株である。

【 0 0 2 3 】

AJ11169は、1977年 8 月 3 日に工業技術院生命工学工業技術研究所（現 独立行政法人 産業技術総合研究所 特許生物寄託センター（〒305-5466 日本国茨城県つくば市東 1 丁目 1 番地 1 中央第 6、以下同様）にFERM P-4161の受託番号で寄託され、1999年 9 月 27 日にブダペスト条約に基づく国際寄託に移管され、FERM BP-6892の受託番号で寄託されている。

AJ12092は、1983年 9 月 29 日に工業技術院生命工学工業技術研究所にFERM P-7273の受託番号で寄託され、1999年 10 月 1 日にブダペスト条約に基づく国際寄託に移管され、FERM BP-6906の受託番号で寄託されている。

AJ11336は、1979年 4 月 25 日に工業技術院生命工学工業技術研究所にFERM P-4939の受託番号で寄託され、1999年 9 月 27 日にブダペスト条約に基づく国際寄託に移管され、FERM BP-6893の受託番号で寄託されている。

AJ11345は、1979年 4 月 25 日に工業技術院生命工学工業技術研究所にFERM P-4948の受託番号で寄託され、1999年 9 月 27 日にブダペスト条約に基づく国際寄託に

移管され、FERM BP-6894の受託番号で寄託されている。

AJ12430は、1988年11月26日に工業技術院生命工学工業技術研究所にFERM BP-228の受託番号で、ブダペスト条約に基づき国際寄託されている。

#### 【0024】

育種によってL-リジン生産能を付与または増強するには、以下のような変異を付与することによって行われる。この様な変異株としては次の様なものがある。S-(2-アミノエチル)-システイン(以下、「AEC」と略記する)耐性変異株(例えば、ブレビバクテリウム・ラクトファーマンタムAJ11082(NRRL B-11470)、特公昭56-1914号、特公昭56-1915号、特公昭57-14157号、特公昭57-14158号、特公昭57-30474号、特公昭58-10075号、特公昭59-4993号、特公昭61-35840号、特公昭62-24074号、特公昭62-36673号、特公平5-11958号、特公平7-112437号、特公平7-112438号参照)、その成長にL-ホモセリン等のアミノ酸を必要とする変異株(特公昭48-28078号、特公昭56-6499号)、AECに耐性を示し、更にL-ロイシン、L-ホモセリン、L-プロリン、L-セリン、L-アルギニン、L-アラニン、L-バリン等のアミノ酸を要求する変異株(米国特許第3708395号及び第3825472号)、DL- $\alpha$ -アミノ- $\epsilon$ -カプロラクタム、 $\alpha$ -アミノ-ラウリルラクタム、アスパラギン酸-アナログ、スルファ剤、キノイド、N-ラウロイルロイシンに耐性を示すL-リジン生産変異株、オキザロ酢酸脱炭酸酵素(デカルボキシラーゼ)または呼吸系酵素阻害剤の耐性を示すL-リジン生産変異株(特開昭50-53588号、特開昭50-31093号、特開昭52-102498号、特開昭53-9394号、特開昭53-86089号、特開昭55-9783号、特開昭55-9759号、特開昭56-32995号、特開昭56-39778号、特公昭53-43591号、特公昭53-1833号)、イノシトールまたは酢酸を要求するL-リジン生産変異株(特開昭55-9784号、特開昭56-8692号)、フルオロピルビン酸または34℃以上の温度に対して感受性を示すL-リジン生産変異株(特開昭55-9783号、特開昭53-86090号)、エチレングリコールに耐性を示し、L-リジンを生産するブレビバクテリウム属またはコリネバクテリウム属の生産変異株(米国特許第4411997号)がある。

#### 【0025】

次に、L-アルギニン又はL-リジン生合成系酵素活性の増強によってL-ア

ミノ酸生産能を付与又は増強する方法を、以下に例示する。

酵素活性の増強は、細胞内の該酵素活性が上昇するように同酵素をコードする遺伝子に変異を導入するか、又は同遺伝子を用いた遺伝子組換え技術を利用することによって、行うことができる。

#### 【0026】

L-アルギニン生合成系酵素としては、N-アセチルグルタミルリン酸レダクターゼ (argC)、オルニチンアセチルトランスフェラーゼ (argJ)、N-アセチルグルタミン酸キナーゼ (argB)、アセチルオルニチントランスアミナーゼ (argD)、オルニチンカルバモイルトランスフェラーゼ (argF)、アルギニノコハク酸シンターゼ (argG)、アルギニノコハク酸リアーゼ (argH)、カルバモイルリン酸シンターゼ (carAB) から選ばれる1種又は2種以上が挙げられる。これらの酵素名の後のカッコ内は、各酵素をコードする遺伝子名である。

#### 【0027】

前記遺伝子によってコードされる酵素の活性が上昇するような変異としては、同遺伝子の転写量が増大するようなプロモーター配列の変異、及び、前記酵素タンパク質の比活性が高くなるような前記遺伝子のコード領域内の変異が挙げられる。

#### 【0028】

また、遺伝子組換え技術を利用して酵素活性を高めるには、例えば、細胞中の同酵素遺伝子のコピー数を高めることによって達成される。例えば、前記遺伝子を含むDNA断片を、微生物で機能するベクター、好ましくはマルチコピー型のベクターと連結して組換えDNAを作製し、これを微生物に導入して形質転換すればよい。

#### 【0029】

遺伝子の発現の増強は、上記の遺伝子増幅による以外に、染色体DNA上またはプラスミド上の該遺伝子のプロモーター等の発現調節配列を強力なものに置換することによっても達成される (WO00/18935)。例えば、lacプロモーター、trpプロモーター、trcプロモーター等が強力なプロモーターとして知られている。また、lysE遺伝子のプロモーター領域に塩基置換等を導入し、より強力なものに改

変することも可能である。これらのプロモーター置換または改変により遺伝子の発現が強化される。これら発現調節配列の改変は、遺伝子のコピー数を高めることと組み合わせてもよい。

#### 【0030】

L-リジン生合成系酵素遺伝子としては、例えば、L-リジン及びL-スレオニンによる相乗的なフィードバック阻害が実質的に解除されたアスパルトキナーゼ $\alpha$ サブユニット蛋白質又は $\beta$ サブユニット蛋白質をコードする遺伝子（W094/25605国際公開パンフレット）、コリネホルム細菌由来の野生型ホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼ遺伝子（特開昭60-87788号公報）、コリネホルム細菌由来の野生型ジヒドロジピコリン酸合成酵素をコードする遺伝子（特公平6-55149号公報）等が知られている。

#### 【0031】

上記のL-アルギニン生合成系酵素の活性を増強する手法は、L-リジンについても同様に適用することができる。

#### 【0032】

また、コリネ型細菌の細胞内のアルギニンリプレッサーが正常に機能しないように改変することによって、L-アルギニン生産能及びL-リジン生産能を付与又は増強することができる。

通常、N-アセチルグルタメートシンターゼ等アルギニンの生合成系遺伝子の発現は、培地中のアルギニン濃度により顕著な阻害を受ける。コリネ型細菌では、いくつかのL-アルギニン生合成系酵素の生成が、L-アルギニンにより抑制されていることが調べられている。さらに、L-アルギニン生合成系酵素のいくつかは、L-アルギニンによる抑制を受けるが、L-アルギニン蓄積量が向上したコリネ型細菌の変異株では、これらの酵素のL-アルギニンによる抑制が解除されていることが報告されている（Agric. Biol. Chem., 43(1), 105, 1979）。

#### 【0033】

一方、エシェリヒア・コリでは、L-アルギニン生合成系のリプレッサー（アルギニンリプレッサー）及びリプレッサーをコードする遺伝子が特定されており（Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. (1987), 84(19), 6697-701）、またリプレッ



サータンパクと各種L-アルギニン生合成系遺伝子との結合相互作用についても調べられている (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. (1987), 84(19), 6697-701、J. Mol. Biol. (1992), 226, 367-386)。

#### 【0034】

アルギニンは、オルニチンやシトルリン等の中間体を経ながら、アルギニン特有の生合成経路を通じて生成されるが、同経路でカルバモイルリン酸が取り込まれる。ゆえにカルバモイルリン酸合成経路を強化することが、アルギニン発酵収率を上昇させる為に必要だと考えられる。

#### 【0035】

カルバモイルリン酸は、炭酸イオン、グルタミン、及びATPから生成される。コリネ型細菌では、炭酸イオンは、培養液中の炭酸イオンにより、またATPは、糖代謝の過程で生成される。したがって、カルバモイルリン酸の生成にはグルタミンの供給が重要である。

#### 【0036】

以上のことから、アルギニンリプレッサーが正常に機能しないように改変することと、後述するグルタミンシンテターゼ活性の上昇とを組み合わせることによって、L-リジン及びL-アルギニンの生産能を一層向上させることができると考えられる。

#### 【0037】

本発明において「アルギニンリプレッサー」とは、L-アルギニン生合成を抑制する作用を有するタンパク質であり、コリネ型細菌において同タンパク質をコードする遺伝子の発現量が増加するとL-アルギニン生産能が低下し、発現量が低下又は消失するとL-アルギニン生産能が向上する。以下、アルギニンリプレッサーをコードする遺伝子をargR遺伝子ともいう。「アルギニンリプレッサーが正常に機能しない」とは、野生株又は非改変株に比べて、アルギニンリプレッサーの活性が低下又は消失していることをいう。

#### 【0038】

ブレヴィバクテリウム・フラバムのargR遺伝子塩基配列及び同遺伝子がコードするアミノ酸配列を配列番号15に、該アミノ配列を配列番号16に示す。

本発明において、活性の低減の対象となるアルギニンリプレッサーは、前記アルギニンリプレッサーのアミノ酸配列において、1または複数の位置において、1または複数のアミノ酸の欠失、置換、挿入または付加を含むアミノ酸配列を含んでいてもよい。

#### 【0039】

「複数の」アミノ酸の数は、タンパク質の三次元構造におけるアミノ酸残基の位置および型によって異なる。これは、以下の理由による。すなわち、いくつかのアミノ酸は、互いに高い相同性を有し、そのようなアミノ酸における差異は、タンパク質の三次元構造に著しい影響を及ぼさない。したがって、本発明の変異型アルギニンリプレッサーは、アルギニンリプレッサーを構成する全アミノ酸残基について、30～50%以上、好ましくは50～70%以上、より好ましくは80～90%以上の相同性を有し、かつアルギニンリプレッサー活性を有するものであってもよい。

#### 【0040】

上記アルギニンリプレッサーと実質的に同一なタンパク質をコードする遺伝子は、argR遺伝子とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ、アルギニンリプレッサー活性を有するタンパク質をコードするDNAが挙げられる。ここでいう「ストリンジェントな条件」とは、いわゆる特異的なハイブリッドが形成され、非特異的なハイブリッドが形成されない条件をいう。この条件を明確に数値化することは困難であるが、一例を示せば、相同性が高いDNA同士、例えば50%以上、好ましくは70%以上、より好ましくは80%以上の相同性を有するDNA同士がハイブリダイズし、それより相同性が低いDNA同士がハイブリダイズしない条件、あるいは通常のサザンハイブリダイゼーションの洗いの条件である60℃、1×SSC、0.1%SDS、好ましくは、0.1×SSC、0.1%SDSに相当する塩濃度でハイブリダイズする条件が挙げられる。

#### 【0041】

コリネ型細菌のアルギニンリプレッサーの活性を低下させるためには、例えば、コリネ型細菌を紫外線照射またはN-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン(NTG)もしくは亜硝酸等の通常変異処理に用いられている変異剤によって処理

し、アルギニンリプレッサーの活性が低下した菌株を選択する方法が挙げられる。また、アルギニンリプレッサーの活性が低下したコリネ型細菌は、変異処理の他に、アルギニンリプレッサーをコードする遺伝子argRの部分配列を欠失し、正常に機能するアルギニンリプレッサーを産生しないように改変したargR遺伝子（欠失型argR遺伝子）を含むDNAでコリネ型細菌を形質転換し、欠失型argRと染色体上のargRとの間で組換えを起こさせることにより、染色体上のargRを破壊することができる。

argR遺伝子の遺伝子破壊は、後述するglnE遺伝子の遺伝子破壊と同様にして行うことができる。

#### 【0042】

argR遺伝子は、目的の微生物のargR遺伝子と相同組換えを起こす程度の相同性を有していれば、由来を特に制限されない。例えば、コリネ型細菌のargR遺伝子として具体的には、前記ブレヴィバクテリウム・フラバムのargR遺伝子、及び、コリネバクテリウム・グルタミカムのargR遺伝子（GenBank accession AF049897）が挙げられる。これらのargR遺伝子は相同性が高く、argR遺伝子を破壊するコリネ型細菌と種又は属が異なるコリネ型細菌又は他の微生物のargR遺伝子であっても、遺伝子破壊に用いることができると考えられる。

#### 【0043】

##### <2>本発明のコリネ型細菌の構築

本発明のコリネ型細菌は、上記のようなL-アルギニン又はL-リジン生産能を有するコリネ型細菌であって、かつ、細胞内のグルタミンシンテターゼ（以下、「GS」ともいう）活性が増強されるように改変されたコリネ型細菌である。

本発明のコリネ型細菌の育種において、L-アルギニン又はL-リジン生産能の付与とGS活性の増強は、どちらを先に行ってもよい。

#### 【0044】

「細胞内のGS活性が増強されるように改変された」とは、細胞当たりのGS活性が非改変株、例えば野生型のコリネ型細菌のそれよりも高くなったことをいう。例えば、細胞当たりのGS分子の数が増加した場合や、GS分子当たりのGS活性が上昇した場合などが該当する。「GS活性」とは、ATPを用いたグルタミン酸およ

びアンモニアからのグルタミンの生成反応を触媒する活性を意味する。また、比較対象となる野生型のコリネ型細菌としては、例えばブレヴィバクテリウム・ラクトファーメンタム ATCC13869 が挙げられる。

#### 【0045】

GS活性が増強されたコリネ型細菌として具体的には、例えば、GS活性が100～150nmol/min/mg菌体タンパク質以上であるコリネ型細菌、あるいは、野生株に比べてGS活性が2～3倍であるコリネ型細菌が好ましい。但し、本発明のコリネ型細菌はこれらに限定されない。GS活性は、例えば、Journal of Fermentation and Bioengineering, Vol.70, No.3, 182-184, 1990に記載の方法によって測定することができる。また、菌体タンパク質は、例えば牛血清アルブミンを標準試料として、Protein Assay (Bio-Rad) を用いて定量することができる。

#### 【0046】

細胞内のグルタミンシンテターゼ活性を増強するには、例えば、GSをコードする遺伝子の発現を増強することによって達成される。同遺伝子の発現量の増強は、GSをコードする遺伝子のコピー数を高めることによって達成される。例えば、GSをコードする遺伝子断片を、該細菌で機能するベクター、好ましくはマルチコピー型のベクターと連結して組換えDNAを作製し、これをコリネ型細菌に導入して形質転換すればよい。

#### 【0047】

GS遺伝子は、コリネ型細菌由来の遺伝子およびエシェリヒア属細菌等の他の生物由来の遺伝子のいずれも使用することができる。このうち、発現の容易さの観点からは、コリネ型細菌由来の遺伝子が好ましい。

#### 【0048】

コリネ型細菌のGSをコードする遺伝子として、既にglnA (FEMS Microbiology Letters 81-88, (154) 1997)、及びglnA2があることが報告されている(特開2002-300887、EP1229121、L.Nolden et al., FEMS Microbiology Letters 201 (2001) 91-98)。

#### 【0049】

ブレヴィバクテリウム・ラクトファーメンタムのglnA遺伝子塩基配列及び同遺伝

子がコードするアミノ酸配列を配列番号19に、該アミノ配列を配列番号20に示す。尚、配列番号19及び20において、開始コドン（塩基番号1～3）がコードするアミノ酸をバリンと記載しているが、メチオニンである可能性が高い。glnA2遺伝子の塩基配列及びそれによってコードされるアミノ酸配列は、特開2002-300887、EP1229121に記載されている。

#### 【0050】

本発明において、GSは、GS活性が低下しない限り、1または複数の位置において、1または複数のアミノ酸の欠失、置換、挿入または付加を含むアミノ酸配列を含んでいてもよい。「複数の」アミノ酸の数は、タンパク質の三次元構造におけるアミノ酸残基の位置および型によって異なる。これは、以下の理由による。すなわち、いくつかのアミノ酸は、互いに高い相同性を有し、そのようなアミノ酸における差異は、タンパク質の三次元構造に著しい影響を及ぼさない。したがって、本発明の変異型GSは、GSを構成する全アミノ酸残基について、30～50%以上、好ましくは50～70%以上、より好ましくは80～90%以上の相同性を有し、かつGS活性を有するものであってもよい。

#### 【0051】

上記のようなGSと実質的に同一なタンパク質をコードする遺伝子は、glnA又はglnA2遺伝子とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ、GS活性を有するタンパク質をコードするDNAが挙げられる。ここでいう「ストリンジェントな条件」とは、いわゆる特異的なハイブリッドが形成され、非特異的なハイブリッドが形成されない条件をいう。この条件を明確に数値化することは困難であるが、一例を示せば、相同性が高いDNA同士、例えば50%以上、好ましくは70%以上、より好ましくは80%以上の相同性を有するDNA同士がハイブリダイズし、それより相同性が低いDNA同士がハイブリダイズしない条件、あるいは通常のサザンハイブリダイゼーションの洗いの条件である60℃、1×SSC、0.1%SDS、好ましくは、0.1×SSC、0.1%SDSに相当する塩濃度でハイブリダイズする条件が挙げられる。

#### 【0052】

また、グルタミンシンテターゼのアデニル化による活性調節が解除されるよ

うにコリネ型細菌を改変することによっても、細胞内のグルタミンシンテターゼ活性を増強することができる。

#### 【0053】

GSは、そのアミノ酸配列中のチロシン残基がアデニリル化されることにより、不活性型に変化する (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 642-649, (58) 1967) (J. Biol. Chem., 3769-3771, (243) 1968)。したがって、このGSのアデニリル化による活性調節を解除することによって、細胞内のGS活性を増強することができる。ここで、アデニリル化による活性調節の解除とは、アデニリル化が実質的に完全に解除されることに加えて、細胞内のGS活性が増強されるようにアデニリル化が低減されることを含む。「低減」とは、GSのアデニリル化が、コリネ型細菌の野生株又は非改変株よりも低減することをいう。比較対象となる野生型のコリネ型細菌とは、例えばブレヴィバクテリウム・ラクトファーメンタム ATCC13869が挙げられる。

以下に、GSのアデニリル化による活性調節を解除する手段を例示する。

#### 【0054】

##### (1) グルタミンシンテターゼのアデニリル化部位の改変

エシェリヒア・コリ等においては、GSのアデニリル化は、一般にグルタミンシンテターゼ・アデニリルトランスフェラーゼ (以下、「ATase」ともいう) によって行われる (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1703-1710, (58) 1967)。コリネ型細菌において、GSは、グルタミンシンテターゼ・アデニリルトランスフェラーゼによってアデニリル化されることによって不活性型に変換される (FEMS Microbiology Letters, 303-310, (173) 1999) (FEMS Microbiology Letters 201 (2001) 91-98)。コリネ型細菌においては、Genebank accession Y13221の配列に示されるglnA遺伝子産物の405位のチロシン残基がアデニリル化されることが示唆されている (FEMS Microbiology Letters, 303-310, (173) 1999)。このチロシン残基を他のアミノ酸残基に置換するようにglnA遺伝子に変異を導入することによってGSのアデニリル化による不活性化を解除できる。

#### 【0055】

また、前記glnA2産物も、glnAと同様にアデニリル化による活性調節を受けて

いると予想される。したがって、glnA2遺伝子に、glnA遺伝子産物の405位のチロシン残基に相当するアミノ酸残基を他のアミノ酸残基、例えばフェニルアラニン残基に置換するようにglnA2遺伝子に変異を導入することによって、同遺伝子がコードするGSのアデニリル化による不活性化を解除できると考えられる。

#### 【0056】

アデニリル化による活性調節が解除されたGSをコードするDNAは、glnA又はglnA2遺伝子の配列を、コードされるGSが上記アデニリル化による活性調節が解除されるような変異を有するように改変することによって、取得することができる。得られた変異遺伝子は、前記L-アルギニン生合成系酵素遺伝子の増強と同様の手段によって、コリネ型細菌に導入することができる。

#### 【0057】

アデニリル化部位が改変されるGSも、GS活性が低下しない限り、上記アデニリル化による活性調節が解除される変異以外に、または複数の位置において、1または複数のアミノ酸の欠失、置換、挿入または付加を含むアミノ酸配列を含んでもよい。

#### 【0058】

##### (2) グルタミンシンテターゼ・アデニリルトランスフェラーゼ活性の低減

グルタミンシンテターゼのアデニリル化による活性調節は、細胞内のグルタミンシンテターゼ・アデニリルトランスフェラーゼ(ATase)活性を低下させることによって、解除することができる。ここで、ATase活性の低下とは、同活性を完全に欠失することに加えて、本発明のコリネ型細菌のATase活性がコリネ型細菌の野生株又は非改変株のそれよりも低くなったことをいう。例えば、細胞当たりのATase分子の数が低下した場合や、ATase分子当たりのATase比活性が低下した場合などが該当する。また、比較対象となる野生型のコリネ型細菌とは、例えばブレヴィバクテリウム・ラクトファーメンタムATCC13869が挙げられる。

#### 【0059】

ATaseをコードする遺伝子としてブレヴィバクテリウム・ラクトファーメンタムATCC13869株のglnEが明らかにされている(EP1229121)。同遺伝子の塩基配列及びアミノ酸配列を配列番号17に、同アミノ酸配列を配列番号18に示す。

本発明において、活性の低減の対象となるATaseは、前記ATaseのアミノ酸配列において、1または複数の位置において、1または複数のアミノ酸の欠失、置換、挿入または付加を含むアミノ酸配列を含んでいてもよい。

#### 【0060】

「複数の」アミノ酸の数は、タンパク質の三次元構造におけるアミノ酸残基の位置および型によって異なる。これは、以下の理由による。すなわち、いくつかのアミノ酸は、互いに高い相同性を有し、そのようなアミノ酸における差異は、タンパク質の三次元構造に著しい影響を及ぼさない。したがって、本発明の変異型ATaseは、ATaseを構成する全アミノ酸残基について、30～50%以上、好ましくは50～70%以上、より好ましくは80～90%以上の相同性を有し、かつATase活性を有するものであってもよい。

#### 【0061】

上記のようなATaseと実質的に同一なタンパク質をコードする遺伝子は、glnE遺伝子とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ、ATase活性を有するタンパク質をコードするDNAが挙げられる。ここでいう「ストリンジェントな条件」とは、いわゆる特異的なハイブリッドが形成され、非特異的なハイブリッドが形成されない条件をいう。この条件を明確に数値化することは困難であるが、一例を示せば、相同性が高いDNA同士、例えば50%以上、好ましくは70%以上、より好ましくは80%以上の相同性を有するDNA同士がハイブリダイズし、それより相同性が低いDNA同士がハイブリダイズしない条件、あるいは通常のサザンハイブリダイゼーションの洗いの条件である60℃、1×SSC、0.1%SDS、好ましくは、0.1×SSC、0.1%SDSに相当する塩濃度でハイブリダイズする条件が挙げられる。

#### 【0062】

コリネ型細菌の細胞内のATase活性を低下させるには、例えば、コリネ型細菌を紫外線照射またはN-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン (NTG) もしくは亜硝酸等の通常変異処理に用いられている変異剤によって処理し、ATase活性が低下した変異株を選択する方法が挙げられる。また、ATase活性が低下したコリネ型細菌は、変異処理の他に、ATaseをコードする遺伝子 (glnE) の部分



配列を欠失し、正常に機能するATaseを産生しないように改変したglnE遺伝子（欠失型glnE）を含むDNAでコリネ型細菌を形質転換し、欠失型glnEと染色体上のglnEとの間で組換えを起こさせることにより、染色体上のglnEを破壊することができる。このような相同組換えを利用した遺伝子置換による遺伝子破壊は既に確立しており、直鎖DNAを用いる方法や温度感受性複製起点を含むプラスミドを用いる方法などがある。

#### 【0063】

欠失型glnEを、宿主染色体上のglnEと置換するには、例えば以下のようにすればよい。温度感受性複製起点とglnEの内部配列とクロラムフェニコール等の薬剤に耐性を示すマーカー遺伝子とを挿入して組換えDNAを調製し、この組換えDNAでコリネ型細菌を形質転換し、温度感受性複製起点が機能しない温度で形質転換株を培養し、続いてこれを薬剤を含む培地で培養することにより、組換えDNAが染色体DNAに組み込まれた形質転換株が得られる。

#### 【0064】

こうして染色体に組換えDNAが組み込まれた株は、染色体上にもともと存在するglnE配列との組換えを起こし、染色体glnEと欠失型glnEとの融合遺伝子2個が組換えDNAの他の部分（ベクター部分、温度感受性複製起点及び薬剤耐性マーカー）を挟んだ状態で染色体に挿入されている。

#### 【0065】

プラスミドに連結したGlnEはプロモーター、開始コドンを含まない内部配列を用いているので、染色体glnEと欠失型glnEとの融合遺伝子2個が組換えDNAの他の部分（ベクター部分、温度感受性複製起点及び薬剤耐性マーカー）を挟んだ状態で染色体に挿入された構造でGlnEの構造遺伝子が分断されていることにより、GlnEは機能を失っている。

#### 【0066】

また、欠失型glnEとして、内部配列を除去したglnEを用いてもよい。その場合は、染色体glnEと欠失型glnEとの融合遺伝子2個が染色体DNAに挿入されている状態では、正常なglnEが優性となり、形質転換株は正常なATaseを発現する。次に、染色体DNA上に欠失型glnEのみを残すために、2個のglnEの組換えによ

り 1 コピーのglnEを、ベクター部分（温度感受性複製起点及び薬剤耐性マーカを含む）とともに染色体DNAから脱落させる。その際、正常なglnEが染色体DNA上に残され、欠失型glnEが切り出される場合と、反対に欠失型glnEが染色体DNA上に残され、正常なglnEが切り出される場合がある。いずれの場合も、温度感受性複製起点が機能する温度で培養すれば、切り出されたDNAはプラスミド状態で細胞内に保持される。次に、温度感受性複製起点が機能しない温度で培養すると、プラスミド上のglnEは、プラスミドとともに細胞から脱落する。そして、PCRまたはサザンハイブリダイゼーション等により、染色体上に欠失型glnEが残った株を選択することによって、glnEが破壊された株を取得することができる。

#### 【0067】

上記のようにして、glnEが破壊された株を取得することができる。

尚、遺伝子破壊に用いるglnE遺伝子は、コリネ型細菌が元々保持しているglnE遺伝子と相同組換えを起こす程度の相同性を有していれば、由来を特に制限されない。たとえば、マイコバクテリウム・ツバクロシスのATase (GenBank ACCESSION Z70692) およびストレプトマイセス・セリカラーのATase (GenBank ACCESSION Y17736) は、コリネ型細菌のATaseとそれぞれ51.9%、33.4%の相同性を有している（特開2002-300887、EP1229121）。

#### 【0068】

##### （3）PIIたんぱく質の活性の低減

また、細胞内のPIIたんぱく質の活性を低下させることによって、GSのアデニル化による不活性化を解除できる。ATaseによるGSのアデニル化にはPIIたんぱく質も関与することが知られている。PIIたんぱく質とは、GS活性を調節するためのシグナル伝達たんぱく質であり、ウリジリルトランスフェラーゼ (UTase) によるウリジリル化を受けることが知られている。ウリジリル化されたPIIたんぱく質は、ATaseによるGSの脱アデニル化を促進し、脱ウリジリル化されたPIIたんぱく質はATaseによるGSのアデニル化を促進する。

#### 【0069】

UTaseの欠損株においてはGSが高度にアデニル化されることが報告されてい

る (J. Bacteriology, 569-577, (134) 1978)。過剰にアデニル化されるこの表現形は、PIIたんぱく質の変異によって抑制される (J. Bacteriology, 816-822, (164) 1985)。すなわち PIIたんぱく質の活性低下によっても、GSのアデニル化による不活性化を解除できる。PIIたんぱく質の活性低下とは、ATaseによるアデニル化を促進する機能が低下することをいう。PIIたんぱく質活性の低下とは、同活性を完全に欠失することに加えて、本発明のコリネ型細菌の PIIたんぱく質活性がコリネ型細菌の野生株又は非改変株のそれよりも低くなったことをいう。例えば、細胞当たりの PIIたんぱく質分子の数が低下した場合や、PIIたんぱく質分子当たりの PIIたんぱく質比活性が低下した場合などが該当する。また、比較対象となる野生型のコリネ型細菌とは、例えばブレヴィバクテリウム・ラクトファーマンタム ATCC13869 が挙げられる。

#### 【 0 0 7 0 】

コリネ型細菌の PIIたんぱく質をコードする glnB 遺伝子は既に単離されており、その欠失により GSのアデニル化による抑制が解除されることが示唆されている (FEMS Microbiology Letters, 303-310, (173) 1999)。

PIIたんぱく質をコードする遺伝子としてブレヴィバクテリウム・ラクトファーマンタムの glnB が明らかにされている (EP1229121)。同遺伝子の塩基配列及びアミノ酸配列を配列番号 2 3 に、同アミノ酸配列を配列番号 2 4 に示す。

本発明において、活性の低減の対象となる PIIたんぱく質は、前記 PIIたんぱく質のアミノ酸配列において、1 または複数の位置において、1 または複数のアミノ酸の欠失、置換、挿入または付加を含むアミノ酸配列を含んでいてもよい。

#### 【 0 0 7 1 】

「複数の」アミノ酸の数は、タンパク質の三次元構造におけるアミノ酸残基の位置および型によって異なる。これは、以下の理由による。すなわち、いくつかのアミノ酸は、互いに高い相同性を有し、そのようなアミノ酸における差異は、タンパク質の三次元構造に著しい影響を及ぼさない。したがって、本発明の変異型 PIIたんぱく質は、PIIたんぱく質を構成する全アミノ酸残基について、3 0 ～ 5 0 % 以上、好ましくは 5 0 ～ 7 0 % 以上、より好ましくは 8 0 ～ 9 0 % 以上の相同性を有し、かつ PIIたんぱく質活性を有するものであってもよい。

## 【0072】

上記のようなPIIたんぱく質と実質的に同一なタンパク質をコードする遺伝子は、glnB遺伝子とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ、PIIたんぱく質活性を有するタンパク質をコードするDNAが挙げられる。ここでいう「ストリンジェントな条件」とは、いわゆる特異的なハイブリッドが形成され、非特異的なハイブリッドが形成されない条件をいう。この条件を明確に数値化することは困難であるが、一例を示せば、相同性が高いDNA同士、例えば50%以上、好ましくは70%以上、より好ましくは80%以上の相同性を有するDNA同士がハイブリダイズし、それより相同性が低いDNA同士がハイブリダイズしない条件、あるいは通常のサザンハイブリダイゼーションの洗いの条件である60℃、1×SSC、0.1%SDS、好ましくは、0.1×SSC、0.1%SDSに相当する塩濃度でハイブリダイズする条件が挙げられる。

## 【0073】

コリネ型細菌のPIIたんぱく質の活性を低下させるためには、例えば、コリネ型細菌を紫外線照射またはN-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン (NTG) もしくは亜硝酸等の通常変異処理に用いられている変異剤によって処理し、PIIたんぱく質の活性が低下した菌株を選択する方法が挙げられる。また、PIIたんぱく質の活性が低下したコリネ型細菌は、変異処理の他に、PIIたんぱく質をコードする遺伝子glnBの部分配列を欠失し、正常に機能するPIIたんぱく質を産生しないように改変したglnB遺伝子（欠失型glnB遺伝子）を含むDNAでコリネ型細菌を形質転換し、欠失型glnBと染色体上のglnBとの間で組換えを起こさせることにより、染色体上のglnBを破壊することができる。

glnB遺伝子の遺伝子破壊は、前記glnE遺伝子の遺伝子破壊と同様に行うことができる。

## 【0074】

## (4) 窒素代謝制御機構の改変

GSのアデニル化による活性調節は、窒素代謝制御たんぱく質が正常に機能しないことによっても解除され得る。

## 【0075】

「窒素制御たんぱく質」とは、前記したようなGSのアミノ酸配列中のチロシン残基のアデニル化によりGSが不活性型に変化する機構（グルタミンシンターゼのアデニル化を中心とした窒素代謝制御機構）に関与する因子であって、正の因子と負の因子が存在する。正の因子は細胞内のGS活性を上昇させる因子であり、負の因子は細胞内のGS活性を低下させる因子である。窒素制御たんぱく質はGSだけでなく、アンモニウムイオンの取り込み遺伝子(Amt, AmtB)の制御も行っている。細胞外のアンモニウムイオン濃度の上昇に伴い、窒素制御たんぱく質がAmt, AmtB等の取り込み遺伝子の活性を低下させることにより、アンモニウムイオンの取り込みが抑えられる。

#### 【0076】

エシェリヒア・コリでは、細胞内のグルタミン濃度が減少すると、窒素代謝制御の正の因子であるNRIが、ウリジリルトランスフェラーゼ(Utase)をコードする遺伝子glnDの発現を調節するプロモーターに結合し、glnDの発現量を上昇させ、ウリジリル化したPIIたんぱく質の増加により、ATaseによるGSの脱アデニル化を促進する事によりGS活性が上昇することが知られている。(Mol Microbiolog y (1998) 29(2),431-447)。

#### 【0077】

バチルス・サブチリスでは、細胞内のグルタミン濃度が減少すると、窒素代謝調節因子の負の因子であるTnrAやGlnRが、ウリジリルトランスフェラーゼ(Utase)をコードする遺伝子glnDの発現を調節するプロモーターから解離し、glnDの発現量を上昇させ、ウリジリル化したPIIたんぱく質の増加により、ATaseによるGSの脱アデニル化を促進する事によりGS活性が上昇することが知られている。

#### 【0078】

窒素代謝制御たんぱく質の改変により、GSのアデニル化を中心とした窒素代謝制御機構が改変され、GS活性が恒常的に上昇させることができる。窒素代謝制御遺伝子が正の因子のときは同因子の活性を増強することにより、負の因子であるときは同因子の活性を低下させることにより、GS活性を恒常的に上昇させることができる。

#### 【0079】

コリネ型細菌では、GSのアデニル化を中心とした窒素代謝制御機構は、負の窒素代謝制御タンパクであるamtR遺伝子産物 (AmtR) によって制御されている (Mol. Microbiol. 2000 Aug;37(4):964-77)。したがって、AmtRが正常に機能しないようにamtR遺伝子を改変することによって、GS活性を上昇させることができる。「AmtRが正常に機能しない」とは、コリネ型細菌の野生株又は非改変株に比べて、AmtRの活性が低下又は消失し、その結果、細胞内のGS活性が上昇することをいう。

#### 【0080】

ブレビバクテリウム・ラクトファーメンタムのamtR遺伝子塩基配列及び同遺伝子がコードするアミノ酸配列を配列番号21に、該アミノ配列を配列番号22に示す。

#### 【0081】

本発明において、活性の低減の対象となるAmtRは、前記AmtRのアミノ酸配列において、1または複数の位置において、1または複数のアミノ酸の欠失、置換、挿入または付加を含むアミノ酸配列を含んでいてもよい。

#### 【0082】

「複数の」アミノ酸の数は、タンパク質の三次元構造におけるアミノ酸残基の位置および型によって異なる。これは、以下の理由による。すなわち、いくつかのアミノ酸は、互いに高い相同性を有し、そのようなアミノ酸における差異は、タンパク質の三次元構造に著しい影響を及ぼさない。したがって、本発明の変異型AmtRは、AmtRを構成する全アミノ酸残基について、30～50%以上、好ましくは50～70%以上、より好ましくは80～90%以上の相同性を有し、かつAmtR活性を有するものであってもよい。

#### 【0083】

上記のようなAmtRと実質的に同一なタンパク質をコードする遺伝子は、amtR遺伝子とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ、AmtRの活性を有するタンパク質をコードするDNAが挙げられる。ここでいう「ストリンジェントな条件」とは、いわゆる特異的なハイブリッドが形成され、非特異的なハイブリッドが形成されない条件をいう。この条件を明確に数値化することは困難である

が、一例を示せば、相同性が高いDNA同士、例えば50%以上、好ましくは70%以上、より好ましくは80%以上の相同性を有するDNA同士がハイブリダイズし、それより相同性が低いDNA同士がハイブリダイズしない条件、あるいは通常のサザンハイブリダイゼーションの洗いの条件である60℃、 $1\times\text{SSC}$ 、0.1%SDS、好ましくは、 $0.1\times\text{SSC}$ 、0.1%SDSに相当する塩濃度でハイブリダイズする条件が挙げられる。

#### 【0084】

コリネ型細菌のAmtRが正常に機能しないように改変するには、例えば、コリネ型細菌を紫外線照射またはN-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン (NTG) もしくは亜硝酸等の通常変異処理に用いられている変異剤によって処理し、AmtRの活性が低下した菌株を選択する方法が挙げられる。また、AmtRの活性が低下したコリネ型細菌は、変異処理の他に、AmtRをコードする遺伝子amtRの部分配列を欠失し、正常に機能するAmtRを産生しないように改変したamtR遺伝子（欠失型amtR遺伝子）を含むDNAでコリネ型細菌を形質転換し、欠失型amtRと染色体上のamtRとの間で組換えを起こさせることにより、染色体上のamtRを破壊することができる。

amtR遺伝子の遺伝子破壊は、前記glnE遺伝子の遺伝子破壊と同様にして行うことができる。

#### 【0085】

GSのアデニリル化の解除は、上記のアデニリル化を受けないようなGSの変異、ATaseの活性低下、PIIたんぱく質の活性低下、及び窒素代謝制御たんぱく質の改変から選ばれる2つ、又は3つ以上の手段を組み合わせてもよい。

#### 【0086】

<2>本発明のコリネ型細菌を用いたL-アルギニン、L-リジンの生産

上記のようにして得られるコリネ型細菌を培地で培養し、該培地中にL-アルギニン、L-リジンを生成蓄積させ、該培地からL-アルギニン、L-リジンを採取することにより、L-アルギニン、L-リジンを効率よく製造することができる。

#### 【0087】

本発明のコリネ型細菌を用いてL-アルギニン、L-リジンを生産するには、炭素源、窒素源、無機塩類、その他必要に応じてアミノ酸、ビタミン等の有機微量栄養素を含有する通常の培地を用いて常法により行うことができる。合成培地または天然培地のいずれも使用可能である。培地に使用される炭素源および窒素源は培養する菌株の利用可能であるものならばいずれの種類を用いてもよい。

#### 【0088】

炭素源としては、グルコース、グリセロール、フラクトース、スクロース、マルトース、マンノース、ガラクトース、澱粉加水分解物、糖蜜等の糖類が使用され、その他、酢酸、クエン酸等の有機酸、エタノール等のアルコール類も単独あるいは他の炭素源と併用して用いられる。

#### 【0089】

窒素源としては、アンモニア、硫酸アンモニウム、炭酸アンモニウム、塩化アンモニウム、りん酸アンモニウム、酢酸アンモニウム等のアンモニウム塩または硝酸塩等が使用される。

#### 【0090】

有機微量栄養素としては、アミノ酸、ビタミン、脂肪酸、核酸、更にこれらのものを含有するペプトン、カザミノ酸、酵母エキス、大豆たん白分解物等が使用され、生育にアミノ酸などを要求する栄養要求性変異株を使用する場合には要求される栄養素を補添することが好ましい。

#### 【0091】

無機塩類としてはりん酸塩、マグネシウム塩、カルシウム塩、鉄塩、マンガン塩等が使用される。

培養は、発酵温度20～45℃、pHを5～9に制御し、通気培養を行う。培養中にpHが下がる場合には、炭酸カルシウムを加えるか、アンモニアガス等のアルカリで中和する。かくして10時間～120時間程度培養することにより、培養液中に著量のL-アルギニン、L-リジンが蓄積される。

#### 【0092】

培養終了後の培養液からL-アルギニン、L-リジンを採取する方法は、公知の回収方法に従って行えばよい。例えば、培養液から菌体を除去した後に、濃縮



晶析することによって採取される。

### 【実施例】

以下、実施例により本発明をさらに具体的に説明する。

### 【0093】

#### 【参考例1】 コリネ型細菌のアルギニンリプレッサー欠損株の構築

##### <1>argR破壊用プラスミドの作製

ブレヴィバクテリウム・フラバム野生株2247株（AJ14067）の染色体DNAを鋳型とし、配列番号1（配列番号15の塩基番号4から28の配列）および配列番号2（配列番号15の塩基番号4230から4211の配列に相補的な配列）に示す塩基配列を有するオリゴヌクレオチドをプライマーとしてPCRを行った。PCRは、Pyrobest DNA polymerase（宝酒造）を用い、98℃10秒、58℃1分、72℃3分を1サイクルとして30サイクル行った。得られた増幅断片を、クローニングベクターpHSG399のマルチクローニングサイト内のSmaIサイトに挿入した。

### 【0094】

挿入されたDNA断片からアルギニンリプレッサーをコードしていると思われるORF全てを欠失させるために、配列番号3（配列番号15の塩基番号2372から2395の配列）および配列番号4（配列番号15の塩基番号1851から1827の配列に相補的な配列）に示す塩基配列を有するオリゴヌクレオチドをプライマーとし、増幅断片が挿入されたpHSG399を鋳型をしてPCRを行った。PCR産物をセルフライゲーションすることにより、pssERを構築した。

### 【0095】

次に、pssERを制限酵素SmaIおよびSalIで消化して得た断片と、実施例1で得た温度感受性プラスミドpSFKT2をSmaI、SalIで消化したものを連結することにより、コリネ型細菌で自律複製能が温度感受性になったargR破壊用プラスミドpssERTを得た。

### 【0096】

##### <2>相同組換えによるコリネ型細菌のアルギニンリプレッサー欠失株の取得

上記のようにして得たプラスミドpssERTを、ブレヴィバクテリウム・ラクトファーマメンタムの野生株2256（ATCC13869）に導入した。プラスミドの導入は電気パ

ルス法（特開平2-207791号）を用いた。本プラスミドは、ブレビバクテリウム・ラクトファーマンタム中で自律複製能が温度感受性であるため、本プラスミドが相同組換えによって染色体に組み込まれた株のみが、プラスミド複製の非許容温度である34℃でカナマイシン耐性株として選択できる。argR破壊用プラスミドが染色体に組み込まれた株は、25  $\mu$ g/mlのカナマイシンを含むCM2G培地プレート（ポリペプトン10g、酵母エキス10g、グルコース5g、NaCl 5g、寒天15gを純水1Lに含む。pH7.2）にて、カナマイシン耐性株として選択した。この段階では、染色体由来の正常なargR遺伝子と、プラスミド由来のORFが欠失したargG遺伝子とが、プラスミド部分を挟んで染色体上にタンデムに存在する。

#### 【0097】

次に、組換え株を、再度相同組換えを起こさせ、プラスミド複製の非許容温度34℃でカナマイシン感受性になった株を選択することにより、プラスミド部分とともにargR遺伝子の一方が脱落した株を選択した。これらの株は、染色体上に正常なargR遺伝子が残された株と、破壊型argR遺伝子が残された株とが存在する。これらの中から、破壊型argR遺伝子のみを保持する株を選択した。染色体上のargR遺伝子が破壊型であるかどうかは、34℃でカナマイシン感受性になった株の染色体を調製し、これを鋳型とし、配列番号1および配列番号2に示す塩基配列を有するオリゴヌクレオチドをプライマーとしてPCRを行い、親株由来の染色体を鋳型にして同様にPCRを行ったものよりも、PCR産物が約600bp短くなることで確認することができる。

#### 【0098】

上記のようにして選択されたargR破壊株のPCR産物のダイレクトシーケンスを行い、目的どおりargR遺伝子が破壊されていることを確認し、2256 $\Delta$ R株を得た。同株は、親株に比べて著量のL-アルギニンを産生する（特開2002-51790参照）。

#### 【0099】

【実施例1】 アデニリルトランスフェラーゼ（GlnE）欠損株の構築

<1>GlnE欠損用プラスミドの作製

ブレビバクテリウム・フラバムATCC14067のglnE配列は既に明らかにされてい

る (EP1229121 A2)。報告されている塩基配列に基づいて、配列表配列番号 5 および 6 に示すプライマーを合成し、ブレビバクテリウム・ラクトファーメンタム ATCC13869 株の染色体 DNA を鋳型にして、PCR 法により glnE 内部断片を増幅した。

#### 【0100】

ブレビバクテリウム・ラクトファーメンタム ATCC13869 株の染色体 DNA の調製は、Bacterial Genome DNA Purification Kit (Advanced Genetic Technologies Corp.) を用いて行った。また、PCR 反応は、Pyrobest DNA Polymerase (宝酒造) を用い、変性 94℃ 30 秒、会合 55℃ 15 秒、伸長 72℃ 2 分の条件で 30 サイクル行った。

#### 【0101】

生成した PCR 産物を常法により精製後、Blunting-Kit (宝酒造) で平滑末端化し、pHSG299 の HincII 部位にライゲーションキット (宝酒造) を用いて連結した後、エシェリヒア・コリ JM109 のコンピテントセル (宝酒造) を形質転換し、IPTG 10 µg/ml, X-Gal 40 µg/ml およびカナマイシン 25 µg/ml を含む L 培地に塗布し、一晚培養した。その後、出現した白色のコロニーを釣り上げ、単コロニー分離し、形質転換体を得た。

#### 【0102】

形質転換体からアルカリ法によりプラスミドを調製した後、構造を確認し、ベクターに glnE 遺伝子の部分断片が挿入されているプラスミドを pΔATase-299 と名付けた。

#### 【0103】

上述の pΔATase-299 は、コリネ型細菌の細胞内で自律複製可能な配列を含まないため、本プラスミドでコリネ型細菌を形質転換した場合、極めて低頻度であるが本プラスミドが相同組換えにより染色体に組み込まれた株が形質転換体として出現する。

#### 【0104】

<2> アルギニンリプレッサー欠損株への pΔATase-299 の導入と培養評価

参考例 1 で取得したアルギニンリプレッサー欠損株 2256 ΔargR 株に、電気パルス法 (特開平 2-207791 号公報参照) によりプラスミド pΔATase299 を形質転換し

、形質転換体を得た。次に、これらの形質転換体を継代培養し、カナマイシン感受性となった株を取得した。PCRにてglnE遺伝子近傍を増幅し、glnE遺伝子が破壊されているかを確認し、2256  $\Delta$  argR のglnE破壊株 (2256  $\Delta$  argR  $\Delta$  glnE) を取得した。得られた形質転換体2256  $\Delta$  argR  $\Delta$  glnEを用いてL-アルギニン、L-リジン生産のための培養を以下のように行った。

#### 【0105】

25  $\mu$ g/mlのカナマイシンを含むCM2Bプレート培地にて培養して得た2256  $\Delta$  argR  $\Delta$  glnEの菌体を、グルコース40g、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  65g、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1g、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.4g、 $\text{FeSO}_4$  0.01g、 $\text{MnSO}_4$  0.01g、 $\text{VB}_1\text{-HCl}$  50  $\mu$ g、ビオチン50  $\mu$ g、大豆加水分解物45mg(N量)、 $\text{CaCO}_3$  50gを純水1Lに含む培地 (KOHでpH7.0に調整されている) に接種し、31.5℃にて培地中の糖が消費されるまでしんとう培養した。

#### 【0106】

培養終了後、培養液中のL-アルギニン蓄積量 (Arg) は、培養液を適当に希釈した後、液体クロマトグラフィーにより分析した。L-リジン蓄積量 (Lys)、L-グルタミン酸蓄積量 (Glu) は、培養液を適当に希釈した後、バイオテックアナライザー (旭化成) により測定した。L-グルタミン (Gln)、N-アセチルグルタミン酸は培養液を希釈した後、液体クロマトグラフィーにより分析した。結果を表1に示す。

#### 【0107】

上記の各菌株のGS活性についても測定した。GS活性は、Journal of Fermentation and Bioengineering, Vol.70, No.3, 182-184, 1990に記載の方法を参考とし、イミダゾール-HCl (pH7.0) 100mM,  $\text{NH}_4\text{Cl}$  0.1mM,  $\text{MnCl}_2$  1mM, ホスホエノールピルビン酸1mM, NADH 0.3mM, ラクテートデヒドロゲナーゼ10U, ピルビン酸キナーゼ25U, ATP 1mM, MSG 10mMを含む溶液に、粗酵素液を加え、30℃における340nmの吸光度変化を測定することによって測定した。ブランクの測定には、上記反応液よりMSGを除いたものを用いた。粗酵素液は、上記の培養液より遠心分離により菌体を分離し、イミダゾール-HCl (pH7.0) 100mMで洗浄後、超音波破碎し、未破碎菌体を遠心分離で除去することにより、調製した。粗酵素液のたんぱく質濃度は、牛血清アルブミンを標準試料として、Protein Assay (Bio-Rad) を用いて

定量した。結果を表 2 に示す。

【0108】

【表 1】

表 1

菌株	Arg (g/L)	Lys (g/L)	Glu (g/L)	Gln (g/L)	N-アセチルグルタミン酸 (g/L)
2256 $\Delta$ argR	2.28	0.81	0.32	0.19	0.0153
2256 $\Delta$ argR $\Delta$ glnE	3.18	1.32	0.4	0.2	0.0381

【0109】

【表 2】

表 2

菌株	G S 活性 (nmol/min/mg)
2256 $\Delta$ argR	51.2
2256 $\Delta$ argR glnE	123.1

【0110】

GlnE欠損株では、親株である2256  $\Delta$  argRと比し、L-アルギニン、L-リジンの蓄積の向上が認められた。G S の比活性は、GlnE欠損株は親株の約2.4倍に向上していた。また、L-アルギニンの前駆体である、N-アセチルグルタミン酸、グルタミン酸の増加も認められた。

2256  $\Delta$  argR  $\Delta$  glnE株は、プライベートナンバーAJ110145が付与され、2003年2月18日に、独立行政法人 産業技術総合研究所 特許生物寄託センター（〒305-5466 日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1 中央第6）に、受託番号FER

M P-19216として寄託されている。

#### 【0111】

##### 【実施例2】GSアデニリル化部位改変株の評価

##### <1>GlnAアデニリル化部位改変プラスミドの構築

コリネ型細菌のglnA遺伝子産物（GlnA）のアデニリル化部位は、既に明らかにされている（FEMS Microbiology Letters, 303-310, (173)1999）。そこで、GlnAアデニリル化部位が改変されたglnA遺伝子で、染色体上のglnA遺伝子と置換することにより、GlnAアデニリル化部位改変株の取得を行った。具体的な方法を以下に記す。

#### 【0112】

まず、ブレビバクテリウム・ラクトファーメンタムATCC13869の染色体DNAを鋳型として、配列番号7と8の合成DNAをプライマーとしてPCRを行い、glnA遺伝子N末端側の増幅産物を得た。一方、glnA遺伝子C末端側の増幅産物を得るために、ブレビバクテリウム・ラクトファーメンタムATCC13869株の染色体DNAを鋳型として、配列番号9と10の合成DNAをプライマーとしてPCRを行った。配列番号8と9にはミスマッチが導入されているので、これらの増幅産物の末端には変異が導入される。具体的には、この変異によってGlnAの405位のチロシン残基がL-フェニルアラニン残基に置換される。

#### 【0113】

次に、変異が導入されたglnA遺伝子断片を得るために、上記glnA N末側およびC末側の遺伝子産物を、それぞれほぼ等モルとなるように混合し、これを鋳型として、配列番号10と11の合成DNAをプライマーとしてPCRを行い、アデニリル化部位に変異が導入されたglnA遺伝子増幅産物を得た。生成したPCR産物を常法により精製後、HincIIで消化し、pHSG299（宝酒造）のHincII部位に挿入した。このプラスミドをpGSA2と名付けた。

#### 【0114】

上述のpGSA2は、コリネ型細菌の細胞内で自律複製可能とする領域を含まないため、本プラスミドでコリネ型細菌を形質転換した場合、極めて低頻度であるが本プラスミドが相同組換えにより染色体に組み込まれた株が形質転換体として出

現する。

#### 【0115】

<2>アルギニンリプレッサー欠損株へのpGSA2の導入と培養評価

参考例1に記載のブレヴィバクテリウム・ラクトファーマンタムATCC13869由来のArgR欠損株である2256ΔR株を、電気パルス法（特開平2-207791号公報参照）により高濃度のプラスミドpGSA2を用いて形質転換し、カナマイシン耐性を指標として形質転換体を得た。次に、これらの形質転換体を継代培養し、カナマイシン感受性となった株を取得した。さらに、カナマイシン感受性株のglnA遺伝子の配列を決定し、その配列中のアデニリル化部位がpGSA2由来のglnAのその領域と置換されたものを2256ΔargRAdeと名付けた。2256ΔargR、2256ΔargRAde株を用いて、L-アルギニン、L-リジン生産のための培養、及びGS酵素活性測定を、実施例1<2>に記載の方法と同様にして行った。その結果を表3、4に示した。

#### 【0116】

##### 【表3】

表3

菌株	Arg (g/L)	Lys (g/L)	Glu (g/L)	Gln (g/L)	N-アセチルクアルタミン酸 (g/L)
2256ΔargR	2.28	0.81	0.32	0.19	0.0153
2256ΔargRAde	2.88	1.48	0.49	0.31	0.314

#### 【0117】

##### 【表4】

表4

菌株	GS 活性 (nmol/min/mg)
----	------------------------

---

2256 $\Delta$ argR	51.2
2256 $\Delta$ argRAde	123.1

---

**【0118】**

2256  $\Delta$  argRAde株では、2256  $\Delta$  argRに比べ、L-アルギニン、L-リジン蓄積の向上が認められた。またアルギニンの前駆体である、L-グルタミン酸、L-グルタミン、N-アセチルグルタミン酸の増加も認められた。GS活性は約2.6倍に上昇していた。

2256  $\Delta$  argRAde株は、プライベートナンバーAJ110146が付与され、2003年2月18日に、独立行政法人 産業技術総合研究所 特許生物寄託センター（〒305-5466 日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1 中央第6）に、受託番号FERM P-19217として寄託されている。

**【0119】****【実施例3】AmtR欠損株の取得と評価****<1>AmtR欠損用プラスミドの作製**

コリネ型細菌のamtR遺伝子産物（AmtR）欠損用のプラスミドの取得は以下のように行なった。

まずブレヴィバクテリウム・ラクトファーメンタムATCC13869株の染色体DNAを抽出し、これを鋳型として、配列番号13と14の合成DNAをプライマーとしてPCR反応を行った。得られたDNA断片を平滑末端化し、これをpHSG299（宝酒造）のHincII部位に挿入した。このプラスミドをp $\Delta$ amtRと名付けた。

**【0120】**

上述のp $\Delta$ amtRは、コリネ型細菌の細胞内で自律複製可能とする領域を含まないため、本プラスミドでコリネ型細菌を形質転換した場合、極めて低頻度であるが本プラスミドが相同組換えにより染色体に組み込まれた株が形質転換体として出現する。

**【0121】****<2>アルギニンリプレッサー欠損株へのp $\Delta$ amtRの導入と培養評価**



参考例 1 で取得したアルギニンリプレッサー欠損株 2256  $\Delta$  argR 株を p $\Delta$  amtR で形質転換し、形質転換体を得た。

次にこれらの形質転換体を継代培養し、カナマイシン感受性となった株を取得した。PCR 法にて amtR 遺伝子近傍を増幅し、amtR 遺伝子が破壊されているかを確認し、2256  $\Delta$  argR amtR 破壊株 (2256  $\Delta$  argR  $\Delta$  amtR) を取得した。得られた形質転換体 2256  $\Delta$  ArgR  $\Delta$  amtR を用いて L-アルギニン、L-リジン生産のための培養を、実施例 1 < 2 > に記載の方法で行った。その結果を表 5、表 6 に示した。

【0122】

【表 5】

表 5

菌株	Arg (g/L)	Lys (g/L)	Glu (g/L)	Gln (g/L)	N-アセチルグルタミン酸 (g/L)
2256 $\Delta$ argR	2.28	0.81	0.32	0.19	0.0153
2256 $\Delta$ argR $\Delta$ amt	3.16	1.48	0.45	0.41	0.0296

【0123】

【表 6】

表 6

	GS 活性 (nmol/min/mg)
2256 $\Delta$ argR	51.2
2256 $\Delta$ argR $\Delta$ AmtR	132.3

【0124】

2256  $\Delta$  argR  $\Delta$  amtR 株では、2256  $\Delta$  argR に比べ、L-アルギニン、L-リジン蓄積の向上が認められた。またアルギニンの前駆体である、グルタミン酸、N-ア

セチルグルタミン酸、グルタミンの蓄積も認められた。GS活性は約2.6倍に上昇していた。

2256  $\Delta$ argR  $\Delta$ amtR株は、プライベートナンバーAJ110144が付与され、2003年2月18日に、独立行政法人 産業技術総合研究所 特許生物寄託センター（〒305-5466 日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1 中央第6）に、受託番号FERM P-19215として寄託されている。

#### 【0125】

##### 〔配列表の説明〕

配列番号1：argR遺伝子増幅用プライマー

配列番号2：argR遺伝子増幅用プライマー

配列番号3：argR遺伝子を含むプラスミドのargR遺伝子ORF以外の部分を増幅するためのプライマー

配列番号4：argR遺伝子を含むプラスミドのargR遺伝子ORF以外の部分を増幅するためのプライマー

配列番号5：glnE破壊用プライマーN

配列番号6：glnE破壊用プライマーC

配列番号7：glnAアデニル化 1st PCRプライマーNN

配列番号8：glnAアデニル化1st PCRプライマーNC

配列番号9：glnAアデニル化 1st PCRプライマーCN

配列番号10：glnAアデニル化1st PCRプライマーCC

配列番号11：glnA 2nd PCRプライマーN

配列番号12：glnA 2nd PCRプライマーC

配列番号13：amtR破壊用プライマーN

配列番号14：amtR破壊用プライマーC

配列番号15：argR遺伝子の塩基配列

配列番号16：前記DNA断片がコードし得るアミノ酸配列

配列番号17：glnE遺伝子の塩基配列

配列番号18：前記DNA断片がコードし得るアミノ酸配列

配列番号19：glnA遺伝子の塩基配列

配列番号20：前記DNA断片がコードし得るアミノ酸配列

配列番号21：amtR遺伝子の塩基配列

配列番号22：前記DNA断片がコードし得るアミノ酸配列

配列番号23：glnB遺伝子の塩基配列

配列番号24：前記DNA断片がコードし得るアミノ酸配列

【0 1 2 6】

【発明の効果】

本発明によれば、コリネ型細菌を用いた発酵法によるL-アルギニン、L-リジンの製造において、窒素代謝制御を改変する事により、L-アルギニン、L-リジンの発酵収率を向上させることが出来る。また、本発明のDNAは、コリネ型細菌のL-アルギニン、L-リジン生産菌の育種に利用することができる。

【0 1 2 7】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Ajinomoto Co., Inc.

<120> Method for producing L-arginine or L-lysine by fermentation

<130> P-B0580

<140>

<141> 2003-03-03

<160> 24

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer for PCR

<400> 1

cccgggtttt cttctgcaac tcggg

25

<210> 2

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer for PCR

<400> 2

gtcgacaagc tcggttggtc ccagc

25

<210> 3

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer for PCR

<400> 3

cccctagttc aaggcttggtt aatc

24

<210> 4

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer for PCR

<400> 4

gtcttacctc ggctggttgg ccagc

25

<210> 5

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 5

agaactacga gtccgccttt ttg

23

<210> 6

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 6

cgatcaccag caaccacgc a

21

<210> 7

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 7

cttcccagta gcaccatacg ac

22

<210> 8

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 8

ctggtggcag ttcgaagagg tccttg

26

<210> 9

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 9

ggacaaggac ctcttcgaac tgccag

26

<210> 10

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 10

cggcgagacc gtcgattggg aggagc

26

<210> 11

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 11

gtagcacctt acgaccaaac cg

22

<210> 12

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 12

ggagccggtc gacgaggagc

20

<210> 13

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 13

gccccgggca ggcaagaatc ctc

23

<210> 14

<211> 21

<212> DNA



<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 14

tccccgggag gctctctgcg g

21

<210> 15

<211> 4235

<212> DNA

<213> Brevibacterium flavum

<220>

<221> CDS

<222> (1852)..(2364)

<400> 15

aaacccgggt tttcttctgc aactcgggcg ccgaagcaaa cgaggctgct ttcaagattg 60  
cacgcttgac tggtcgttcc cggattctgg ctgcagttca tggtttccac ggccgcacca 120  
tgggttcctt cgcgctgact ggccagccag acaagcgtga agcgttcctg ccaatgccaa 180  
gcggtgtgga gttctaccct tacggcgaca ccgattactt gcgcaaaatg gtagaaacca 240  
acccaacgga tgtggctgct atcttcctcg agccaatcca gggtgaaacg ggcgttggtc 300  
cagcacctga aggattcctc aaggcagtg cgcagctgtg cgatgagtac ggcattctga 360  
tgatcaccga tgaagtccag actggcggtg gccgtaccgg cgatttcttt gcacatcagc 420  
acgatggcgt tgttcccgat gtggtgacca tggccaaggg acttggcggc ggtcttccca 480  
tcggtgcttg tttggccact ggccgtgcag ctgaattgat gaccccaggc aagcacggca 540  
ccactttcgg tggcaacca gttgcttgtg cagctgccaa ggcagtgtg tctgttgtcg 600  
atgacgcttt ctgcgcagaa gttaccgcga agggcgagct gttcaaggta cttcttgcca 660

aggttgacgg cgtttagac gtccgtggca ggggcttgat gttgggcgtg gtgctggagc 720  
 gcgacgtcgc aaagcaagct gttcttgatg gttttaagca cggcgttatt ttgaatgcac 780  
 cggcggacaa cattatccgt ttgacccgc cgctggatgat caccgacgaa gaaatcgagc 840  
 acgcagtcaa ggctattgcc gagacaatcg cataaaggac ttaaacttat gacttcacaa 900  
 ccacaggttc gccatttcct ggctgatgat gatctcacc ctgcagagca ggcagaggtt 960  
 ttgaccctag ccgcaaagct caaggcagcg ccgttttcgg agcgtccact cgagggacca 1020  
 aagtccttg cagttctttt tgataagact tcaactcgta ctcgtttctc cttcgacgcg 1080  
 ggcatcgctc atttgggtgg acatgccatc gtcgtggatt ccggcagctc acagatgggt 1140  
 aagggcgaga ccctgcagga caccgcagct gtattgtccc gctacgtgga agcaattgtg 1200  
 tggcgcacct acgcacacag caatttcac gccatggcgg agacgtccac tgtgccgctg 1260  
 gtgaactcct tgtccgatga tctgcacca tgccagattc tggctgatct gcagaccatc 1320  
 gtggaaaacc tcagccctga agaaggccca gcaggcctta aggtaagaa ggctgtgtac 1380  
 ctgggcgatg gcgacaacaa catggccaac tcctacatga ttggctttgc caccgcgggc 1440  
 atggatattt ccatcatcgc tcctgaaggg ttccagcctc gtgcggaatt cgtggagcgc 1500  
 gcggaaaagc gtggccagga aaccggcgcg aaggttggtg tcaccgacag cctcgacgag 1560  
 gttgccggcg ccgatgttgt catcaccgat acctgggtat ccatgggtat ggaaaacgac 1620  
 ggcatcgatc gcaccacacc tttcgttcct taccaggtca acgatgaggt catggcgaaa 1680  
 gctaacgacg gcgccatctt cctgactgc cttcctgcct accgcggcaa agaagtggca 1740  
 gcctccgtga ttgatggacc agcgtccaaa gttttcgatg aagcagaaaa ccgcctccac 1800  
 gctcagaaag cactgctggt gtggctgctg gccaccagc cgaggtaaga c atg tct 1857

Met Ser

1

ctt ggc tca acc ccg tca aca ccg gaa aac tta aat ccc gtg act cgc 1905  
 Leu Gly Ser Thr Pro Ser Thr Pro Glu Asn Leu Asn Pro Val Thr Arg  
 5 10 15  
 act gca cgc caa gct ctc att ttg cag att ttg gac aaa caa aaa gtc 1953  
 Thr Ala Arg Gln Ala Leu Ile Leu Gln Ile Leu Asp Lys Gln Lys Val  
 20 25 30  
 acc agc cag gta caa ctg tct gaa ttg ctg ctg gat gaa ggc atc gat 2001

Thr Ser Gln Val Gln Leu Ser Glu Leu Leu Leu Asp Glu Gly Ile Asp  
 35 40 45 50  
 atc acc cag gcc acc ttg tcc cgg gat ctc gat gaa ctc ggt gca cgc 2049  
 Ile Thr Gln Ala Thr Leu Ser Arg Asp Leu Asp Glu Leu Gly Ala Arg  
 55 60 65  
 aag gtt cgc ccc gat ggg gga cgc gcc tac tac gcg gtc ggc cca gta 2097  
 Lys Val Arg Pro Asp Gly Gly Arg Ala Tyr Tyr Ala Val Gly Pro Val  
 70 75 80  
 gat agc atc gcc cgc gaa gat ctc cgg ggt ccg tcg gag aag ctg cgc 2145  
 Asp Ser Ile Ala Arg Glu Asp Leu Arg Gly Pro Ser Glu Lys Leu Arg  
 85 90 95  
 cgc atg ctt gat gaa ctg ctg gtt tct aca gat cat tcc ggc aac atc 2193  
 Arg Met Leu Asp Glu Leu Leu Val Ser Thr Asp His Ser Gly Asn Ile  
 100 105 110  
 gcg atg ctg cgc acc ccg ccg gga gct gcc cag tac ctg gca agt ttc 2241  
 Ala Met Leu Arg Thr Pro Pro Gly Ala Ala Gln Tyr Leu Ala Ser Phe  
 115 120 125 130  
 atc gat agg gtg ggg ctg aaa gaa gtc gtt ggc acc atc gct ggc gat 2289  
 Ile Asp Arg Val Gly Leu Lys Glu Val Val Gly Thr Ile Ala Gly Asp  
 135 140 145  
 gac acc gtt ttt gtt ctc gcc cgt gat ccg ctc aca ggt aaa gaa cta 2337  
 Asp Thr Val Phe Val Leu Ala Arg Asp Pro Leu Thr Gly Lys Glu Leu  
 150 155 160  
 ggt gaa tta ctc agc ggg cgc acc act taaagcgccc ctagtccaag 2384  
 Gly Glu Leu Leu Ser Gly Arg Thr Thr  
 165 170  
 gcttggttaat cgcttggttaa tgcaggcagg taagggtataa cccgagtgtt ttttcgagga 2444  
 ataccaaccc tttcaacaca ataattttct ttaaacaatcc ttgctgtcca ccacggctgg 2504  
 caaggaactt aaaatgaagg agcacacctc atgactaacc gcatcgttct tgcatactcc 2564

ggcgggtctgg acaccactgt ggcaattcca tacctgaaga agatgattga tggatgaagtc 2624  
atcgcagttt ctctcgacct gggccagggt ggagagaaca tggacaacgt tcgccagcgt 2684  
gcattggatg ccggtgcagc tgagtccatc gttgttgatg caaaggatga gttcgctgag 2744  
gagtactgcc tgccaacat caaggcaaac ggcatgtaca tgaagcagta cccactgggt 2804  
tctgcaatct cccgcccact gatcgtcaag cacctcgttg aggctggcaa gcagttcaac 2864  
ggtaccacag ttgcacacgg ctgcaactgg aagggaacg accaggttcg tttcgaggtc 2924  
ggcttcatgg acaccgatcc aaacctggag atcattgcac ctgctcgtga cttcgcatgg 2984  
accgcgcaca aggctatcgc cttcgccgag gagaacaacg ttccaatcga gcagtccgtg 3044  
aagtcccat tctccatcga ccagaacgtc tggggccgcg ctattgagac cggttacctg 3104  
gaagatctgt ggaatgctcc aaccaaggac atctacgat acaccgagga tccagctctg 3164  
ggtaacgctc cagatgaggt catcatctcc ttcgagggtg gcaagccagt ctccatgat 3224  
ggccgtccag tctccgtact gcaggctatt gaagagctga accgtcgtgc aggcgcacag 3284  
ggcgttggcc gccttgacat ggttgaggac cgtctcgttg gcatcaagtc ccgcgaaatc 3344  
tacgaagcac caggcgcaat cgcactgatt aaggctcacg aggctttgga agatgtcacc 3404  
atcgagcgcg aactggctcg ctacaagcgt ggcgttgacg cacgttgggc tgaggaagta 3464  
tacgacggcc tgtggttcgg acctctgaag cgctccctgg acgcgttcat tgattccacc 3524  
caggagcacg tcaccggcga tatccgatg gttctgcacg caggttccat caccatcaat 3584  
ggtcgtcgtt ccagccactc cctgtacgac ttcaacctgg ctacctacga caccggcgac 3644  
accttcgacc agacctggc taagggttt gtccagctgc acggtctgtc ctccaagatc 3704  
gctaacaagc gcgatcgca agctggcaac aactaagcca cttttcaag catccagact 3764  
agaacttcaa gtatttagaa agtagaagaa caccacatgg aacagcacgg aaccaatgaa 3824  
ggtgcgctgt ggggcggccg cttctccgtt ggacctccg aggccatgtt cgccttgagt 3884  
gtctccactc atttcgactg ggttttggcc cttatgatg tgttggcctc caaggcacac 3944  
gccaagggtt tgcaccaagc agagctactt tctgatgaag atctagccac catgctgggt 4004  
ggtcttgatc agctgggcaa ggatgtcgcc gacggaacct tcgggtccgt gccttctgat 4064  
gaggatgtgc acggcgcat ggaacgcgt ctgattgacc gcgttgggtc tgagggtgggc 4124  
ggccgtctgc gcgctggctg ttcccgaac gaccaggtgg caacctgtt ccgcatgtgg 4184  
gtccgcgacg cagtgcgca catcgcgctg ggaacaaccg agcttgtcga c 4235

&lt;210&gt; 16

&lt;211&gt; 171

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Brevibacterium flavum

&lt;400&gt; 16

Met Ser Leu Gly Ser Thr Pro Ser Thr Pro Glu Asn Leu Asn Pro Val

1 5 10 15

Thr Arg Thr Ala Arg Gln Ala Leu Ile Leu Gln Ile Leu Asp Lys Gln

20 25 30

Lys Val Thr Ser Gln Val Gln Leu Ser Glu Leu Leu Leu Asp Glu Gly

35 40 45

Ile Asp Ile Thr Gln Ala Thr Leu Ser Arg Asp Leu Asp Glu Leu Gly

50 55 60

Ala Arg Lys Val Arg Pro Asp Gly Gly Arg Ala Tyr Tyr Ala Val Gly

65 70 75 80

Pro Val Asp Ser Ile Ala Arg Glu Asp Leu Arg Gly Pro Ser Glu Lys

85 90 95

Leu Arg Arg Met Leu Asp Glu Leu Leu Val Ser Thr Asp His Ser Gly

100 105 110

Asn Ile Ala Met Leu Arg Thr Pro Pro Gly Ala Ala Gln Tyr Leu Ala

115 120 125

Ser Phe Ile Asp Arg Val Gly Leu Lys Glu Val Val Gly Thr Ile Ala

130 135 140

Gly Asp Asp Thr Val Phe Val Leu Ala Arg Asp Pro Leu Thr Gly Lys

145 150 155 160

Glu Leu Gly Glu Leu Leu Ser Gly Arg Thr Thr

165 170

&lt;210&gt; 17

&lt;211&gt; 3138

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Brevibacterium lactofermentum

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1)..(3138)

&lt;400&gt; 17

```

atg tca gga ccg tta aga agt gaa cgt aaa gtc gtt ggc ttt gtc aga 48
Met Ser Gly Pro Leu Arg Ser Glu Arg Lys Val Val Gly Phe Val Arg
   1             5             10            15
gac cca ctg cca aaa gtt ggt tct tta tcg ctg aaa tct gag cat gcc 96
Asp Pro Leu Pro Lys Val Gly Ser Leu Ser Leu Lys Ser Glu His Ala
           20             25             30
caa gca gat cta gag cat ttg ggt tgg cgc aat gtt gag tct ttg gat 144
Gln Ala Asp Leu Glu His Leu Gly Trp Arg Asn Val Glu Ser Leu Asp
           35             40             45
ttg ttg tgg ggc ttg tca ggt gca ggc gat ccc gat gtc gcg ctg aac 192
Leu Leu Trp Gly Leu Ser Gly Ala Gly Asp Pro Asp Val Ala Leu Asn
           50             55             60
ctt ctt att cgg ctg tat cag gca ctt gaa gca atc ggc gag gat gct 240
Leu Leu Ile Arg Leu Tyr Gln Ala Leu Glu Ala Ile Gly Glu Asp Ala
           65             70             75             80
cga aac gag ctt gat caa gag att cgc cag gat gaa gaa cta cga gtc 288
Arg Asn Glu Leu Asp Gln Glu Ile Arg Gln Asp Glu Glu Leu Arg Val
           85             90             95
cgc ctt ttt gca ttg ttg ggt ggt tcc tcg gct gtc ggt gat cac ttg 336

```

Arg Leu Phe Ala Leu Leu Gly Gly Ser Ser Ala Val Gly Asp His Leu	
100	105 110
gtc gcc aat cct ttg cag tgg aaa ctc tta aaa ctt gat gcg cca tcg	384
Val Ala Asn Pro Leu Gln Trp Lys Leu Leu Lys Leu Asp Ala Pro Ser	
115	120 125
agg gaa gag atg ttt cag gcg ctg ctg gaa tct gtg aaa gct cag cct	432
Arg Glu Glu Met Phe Gln Ala Leu Leu Glu Ser Val Lys Ala Gln Pro	
130	135 140
gct gtg ctt gag gtt gag gat ttc agc gat gca cac aac att gcc cga	480
Ala Val Leu Glu Val Glu Asp Phe Ser Asp Ala His Asn Ile Ala Arg	
145	150 155 160
gac gat ttg agc acg cct ggt ttt tac acg gct agt gtt acc ggg cct	528
Asp Asp Leu Ser Thr Pro Gly Phe Tyr Thr Ala Ser Val Thr Gly Pro	
165	170 175
gaa gca gag cga gtc ttg aaa tgg act tat cgc acg ttg ctg acc cgg	576
Glu Ala Glu Arg Val Leu Lys Trp Thr Tyr Arg Thr Leu Leu Thr Arg	
180	185 190
att gct gcg cat gat tta gcg ggt acc tat ccc acc gac atg cgg aga	624
Ile Ala Ala His Asp Leu Ala Gly Thr Tyr Pro Thr Asp Met Arg Arg	
195	200 205
aaa ggt ggc gat cct gtt ccg ttt agc aca gtg acc atg cag ctc agc	672
Lys Gly Gly Asp Pro Val Pro Phe Ser Thr Val Thr Met Gln Leu Ser	
210	215 220
gac cta gct gat gct gct ttg act gct gct tta gct gtg gca att gcc	720
Asp Leu Ala Asp Ala Ala Leu Thr Ala Ala Leu Ala Val Ala Ile Ala	
225	230 235 240
aat gtt tat ggt gaa aag ccg gtt gat tca gct tta tct gtc atc gcg	768
Asn Val Tyr Gly Glu Lys Pro Val Asp Ser Ala Leu Ser Val Ile Ala	
245	250 255

atg ggc aaa tgt ggc gcg cag gaa ttg aac tac att tca gat gtg gac	816
Met Gly Lys Cys Gly Ala Gln Glu Leu Asn Tyr Ile Ser Asp Val Asp	
260 265 270	
gtg gtg ttt gtt gca gag ccg gca aac tct aaa tca aca cgc acc gca	864
Val Val Phe Val Ala Glu Pro Ala Asn Ser Lys Ser Thr Arg Thr Ala	
275 280 285	
gca gag ctc att cgc atc ggt agc aac tcg ttc ttt gag gtg gat gca	912
Ala Glu Leu Ile Arg Ile Gly Ser Asn Ser Phe Phe Glu Val Asp Ala	
290 295 300	
gca ctt cgc cca gaa ggt aaa agt ggc gct ctt gtg cgc tct ttg gat	960
Ala Leu Arg Pro Glu Gly Lys Ser Gly Ala Leu Val Arg Ser Leu Asp	
305 310 315 320	
tcc cat atg gcg tat tac aag cgc tgg gcg gaa acc tgg gaa ttt cag	1008
Ser His Met Ala Tyr Tyr Lys Arg Trp Ala Glu Thr Trp Glu Phe Gln	
325 330 335	
gca ctg ctg aaa gct cgt ccc atg acg ggt gat att gac ctt ggg cag	1056
Ala Leu Leu Lys Ala Arg Pro Met Thr Gly Asp Ile Asp Leu Gly Gln	
340 345 350	
tcc tat gtg gat gct ctt tca ccg ttg att tgg gcg gct agc cag cgg	1104
Ser Tyr Val Asp Ala Leu Ser Pro Leu Ile Trp Ala Ala Ser Gln Arg	
355 360 365	
gaa tca ttt gtc aca gat gtc caa gct atg cgc cgt cga gtg ttg gac	1152
Glu Ser Phe Val Thr Asp Val Gln Ala Met Arg Arg Arg Val Leu Asp	
370 375 380	
aat gtt ccg gaa gac ttg cgt gat cgt gag ctg aag ctt ggt cgc ggt	1200
Asn Val Pro Glu Asp Leu Arg Asp Arg Glu Leu Lys Leu Gly Arg Gly	
385 390 395 400	
ggt ttg agg gat gtg gag ttt gct gtc cag ctc ctt cag atg gtg cat	1248
Gly Leu Arg Asp Val Glu Phe Ala Val Gln Leu Leu Gln Met Val His	



405	410	415	
ggt cgc att gat gag acg ttg cgg gtt cgg tca acg gta aat gct ttg	1296		
Gly Arg Ile Asp Glu Thr Leu Arg Val Arg Ser Thr Val Asn Ala Leu			
420	425	430	
cat gtg ttg gtt gat cag gga tat gtg ggt cgt gaa gac ggg cat aat	1344		
His Val Leu Val Asp Gln Gly Tyr Val Gly Arg Glu Asp Gly His Asn			
435	440	445	
ctc att gag tcg tat gag ttt ttg cgc ctg ttg gag cat cgc ctt caa	1392		
Leu Ile Glu Ser Tyr Glu Phe Leu Arg Leu Leu Glu His Arg Leu Gln			
450	455	460	
ttg gag cgg atc aag cgc act cac ttg tta ccg aaa cct gat gac cga	1440		
Leu Glu Arg Ile Lys Arg Thr His Leu Leu Pro Lys Pro Asp Asp Arg			
465	470	475	480
atg aat atg cgc tgg ttg gcg cgc gct tct ggg ttt act ggt tcg atg	1488		
Met Asn Met Arg Trp Leu Ala Arg Ala Ser Gly Phe Thr Gly Ser Met			
485	490	495	
gag caa agt tcg gcc aaa gct atg gaa cgg cat ttg cgt aag gtt cgt	1536		
Glu Gln Ser Ser Ala Lys Ala Met Glu Arg His Leu Arg Lys Val Arg			
500	505	510	
ttg cag att cag tcg ttg cat agt cag ctg ttt tat cgg cca ctg ctg	1584		
Leu Gln Ile Gln Ser Leu His Ser Gln Leu Phe Tyr Arg Pro Leu Leu			
515	520	525	
aac tct gtg gtc aac ttg agc gcg gat gcc atc aga ttg tct ccg gat	1632		
Asn Ser Val Val Asn Leu Ser Ala Asp Ala Ile Arg Leu Ser Pro Asp			
530	535	540	
gct gca aag cta caa ttg ggg gca ttg gga tac ctg cat cca tca cgt	1680		
Ala Ala Lys Leu Gln Leu Gly Ala Leu Gly Tyr Leu His Pro Ser Arg			
545	550	555	560
gct tat gaa cac ctg act gct ctt gca tca gga gct agc cgt aaa gcc	1728		

Ala Tyr Glu His Leu Thr Ala Leu Ala Ser Gly Ala Ser Arg Lys Ala  
565 570 575  
aag att cag gcg atg ttg ctg ccc acg ttg atg gag tgg ctg tct caa 1776  
Lys Ile Gln Ala Met Leu Leu Pro Thr Leu Met Glu Trp Leu Ser Gln  
580 585 590  
aca gct gaa cca gat gcg gga ttg ctg aat tac cgc aag ctt tct gat 1824  
Thr Ala Glu Pro Asp Ala Gly Leu Leu Asn Tyr Arg Lys Leu Ser Asp  
595 600 605  
gct tcc tat gat cgc agc tgg ttt ttg cgc atg ctg cgt gat gag ggc 1872  
Ala Ser Tyr Asp Arg Ser Trp Phe Leu Arg Met Leu Arg Asp Glu Gly  
610 615 620  
gta gtg ggg cag cgg ttg atg cgt att ttg gga aat tct ccc tat att 1920  
Val Val Gly Gln Arg Leu Met Arg Ile Leu Gly Asn Ser Pro Tyr Ile  
625 630 635 640  
tct gaa ctg att atc tcc act ccg gac ttt gtg aaa cag ctg ggt gat 1968  
Ser Glu Leu Ile Ile Ser Thr Pro Asp Phe Val Lys Gln Leu Gly Asp  
645 650 655  
gcg gcg tct ggt cct aaa ttg ctt gct act gca ccg act cag gtt gtg 2016  
Ala Ala Ser Gly Pro Lys Leu Leu Ala Thr Ala Pro Thr Gln Val Val  
660 665 670  
aaa gca atc aag gcg acg gtg tcg cgt cat gag tca cct gat cgg gcg 2064  
Lys Ala Ile Lys Ala Thr Val Ser Arg His Glu Ser Pro Asp Arg Ala  
675 680 685  
atc cag gct gca cga tcg ctg agg agg cag gag ctg gca cgc att gcc 2112  
Ile Gln Ala Ala Arg Ser Leu Arg Arg Gln Glu Leu Ala Arg Ile Ala  
690 695 700  
tct gct gat ttg ctc aac atg ctc act gtt cag gaa gta tgc caa agc 2160  
Ser Ala Asp Leu Leu Asn Met Leu Thr Val Gln Glu Val Cys Gln Ser  
705 710 715 720

ttg tca cta gtc tgg gat gcg gtg ttg gat gct gcc ttg gat gcg gaa	2208
Leu Ser Leu Val Trp Asp Ala Val Leu Asp Ala Ala Leu Asp Ala Glu	
725 730 735	
atc cgt gct gca ctt aac gat cca cag aaa cca gat cag cct ctg gcc	2256
Ile Arg Ala Ala Leu Asn Asp Pro Gln Lys Pro Asp Gln Pro Leu Ala	
740 745 750	
aat att tct gtg atc ggc atg ggc cgt ttg ggt gga gca gaa ctt gga	2304
Asn Ile Ser Val Ile Gly Met Gly Arg Leu Gly Gly Ala Glu Leu Gly	
755 760 765	
tac ggt tct gat gcc gat gtg atg ttt gta tgc gag ccg gta gcc ggt	2352
Tyr Gly Ser Asp Ala Asp Val Met Phe Val Cys Glu Pro Val Ala Gly	
770 775 780	
gtg gaa gag cat gag gcc gtc aca tgg tct att gcg atc tgt gat tcc	2400
Val Glu Glu His Glu Ala Val Thr Trp Ser Ile Ala Ile Cys Asp Ser	
785 790 795 800	
atg cgg tcg agg ctt gcg cag cct tcc ggt gat cca cct ttg gag gtg	2448
Met Arg Ser Arg Leu Ala Gln Pro Ser Gly Asp Pro Pro Leu Glu Val	
805 810 815	
gat ctg ggg ctg cgt cct gaa ggg aga tct ggt gcg att gtg cgc acc	2496
Asp Leu Gly Leu Arg Pro Glu Gly Arg Ser Gly Ala Ile Val Arg Thr	
820 825 830	
gtt gat tcc tat gtg aag tac tac gaa aag tgg ggt gaa act tgg gag	2544
Val Asp Ser Tyr Val Lys Tyr Tyr Glu Lys Trp Gly Glu Thr Trp Glu	
835 840 845	
att cag gcg ctg ctg agg gct gcg tgg gtt gct ggt gat cgt gag ctg	2592
Ile Gln Ala Leu Leu Arg Ala Ala Trp Val Ala Gly Asp Arg Glu Leu	
850 855 860	
ggc att aag ttc ttg gag tcg att gat cgt ttc cgc tac cca gtt gac	2640
Gly Ile Lys Phe Leu Glu Ser Ile Asp Arg Phe Arg Tyr Pro Val Asp	

865	870	875	880	
ggg gca acg cag gcg cag ctt cgt gaa gtt cgt cga att aag gcg agg	2688			
Gly Ala Thr Gln Ala Gln Leu Arg Glu Val Arg Arg Ile Lys Ala Arg				
885	890	895		
gtg gat aat gag agg ctt ccg cgc ggg gct gat cga aat acc cat acc	2736			
Val Asp Asn Glu Arg Leu Pro Arg Gly Ala Asp Arg Asn Thr His Thr				
900	905	910		
aag ctg ggt cgg gga gcg tta act gac atc gag tgg act gtg cag ttg	2784			
Lys Leu Gly Arg Gly Ala Leu Thr Asp Ile Glu Trp Thr Val Gln Leu				
915	920	925		
ttg acc atg atg cat gct cat gag att ccg gag ctg cac aat acg tcg	2832			
Leu Thr Met Met His Ala His Glu Ile Pro Glu Leu His Asn Thr Ser				
930	935	940		
acg ttg gaa gtt ctt gaa gtg ctg gaa aag cat cag att att aac cct	2880			
Thr Leu Glu Val Leu Glu Val Leu Glu Lys His Gln Ile Ile Asn Pro				
945	950	955	960	
gtg cag gtg cag acg ctt cgg gaa gcg tgg ctg acg gca acg gct gct	2928			
Val Gln Val Gln Thr Leu Arg Glu Ala Trp Leu Thr Ala Thr Ala Ala				
965	970	975		
agg aat gcg ctt gtg ctg gtc agg ggt aag aga tta gat cag tta cct	2976			
Arg Asn Ala Leu Val Leu Val Arg Gly Lys Arg Leu Asp Gln Leu Pro				
980	985	990		
act cct ggt ccg cac ctt gcg cag gtg gct ggt gcg tct ggt tgg gat	3024			
Thr Pro Gly Pro His Leu Ala Gln Val Ala Gly Ala Ser Gly Trp Asp				
995	1000	1005		
cca aat gag tac cag gag tat ttg gaa aac tat ctg aaa gtg acc agg	3072			
Pro Asn Glu Tyr Gln Glu Tyr Leu Glu Asn Tyr Leu Lys Val Thr Arg				
1010	1015	1020		
aag agt cgt cag gtt gtt gat gaa gtc ttc tgg ggt gtg gac tct atg	3120			

Lys Ser Arg Gln Val Val Asp Glu Val Phe Trp Gly Val Asp Ser Met

1025 1030 1035 1040

gag caa cgt gag ttt tag 3138

Glu Gln Arg Glu Phe

1045

<210> 18

<211> 1045

<212> PRT

<213> Brevibacterium lactofermentum

<400> 18

Met Ser Gly Pro Leu Arg Ser Glu Arg Lys Val Val Gly Phe Val Arg

1 5 10 15

Asp Pro Leu Pro Lys Val Gly Ser Leu Ser Leu Lys Ser Glu His Ala

20 25 30

Gln Ala Asp Leu Glu His Leu Gly Trp Arg Asn Val Glu Ser Leu Asp

35 40 45

Leu Leu Trp Gly Leu Ser Gly Ala Gly Asp Pro Asp Val Ala Leu Asn

50 55 60

Leu Leu Ile Arg Leu Tyr Gln Ala Leu Glu Ala Ile Gly Glu Asp Ala

65 70 75 80

Arg Asn Glu Leu Asp Gln Glu Ile Arg Gln Asp Glu Glu Leu Arg Val

85 90 95

Arg Leu Phe Ala Leu Leu Gly Gly Ser Ser Ala Val Gly Asp His Leu

100 105 110

Val Ala Asn Pro Leu Gln Trp Lys Leu Leu Lys Leu Asp Ala Pro Ser

115 120 125

Arg Glu Glu Met Phe Gln Ala Leu Leu Glu Ser Val Lys Ala Gln Pro

130 135 140  
Ala Val Leu Glu Val Glu Asp Phe Ser Asp Ala His Asn Ile Ala Arg  
145 150 155 160  
Asp Asp Leu Ser Thr Pro Gly Phe Tyr Thr Ala Ser Val Thr Gly Pro  
165 170 175  
Glu Ala Glu Arg Val Leu Lys Trp Thr Tyr Arg Thr Leu Leu Thr Arg  
180 185 190  
Ile Ala Ala His Asp Leu Ala Gly Thr Tyr Pro Thr Asp Met Arg Arg  
195 200 205  
Lys Gly Gly Asp Pro Val Pro Phe Ser Thr Val Thr Met Gln Leu Ser  
210 215 220  
Asp Leu Ala Asp Ala Ala Leu Thr Ala Ala Leu Ala Val Ala Ile Ala  
225 230 235 240  
Asn Val Tyr Gly Glu Lys Pro Val Asp Ser Ala Leu Ser Val Ile Ala  
245 250 255  
Met Gly Lys Cys Gly Ala Gln Glu Leu Asn Tyr Ile Ser Asp Val Asp  
260 265 270  
Val Val Phe Val Ala Glu Pro Ala Asn Ser Lys Ser Thr Arg Thr Ala  
275 280 285  
Ala Glu Leu Ile Arg Ile Gly Ser Asn Ser Phe Phe Glu Val Asp Ala  
290 295 300  
Ala Leu Arg Pro Glu Gly Lys Ser Gly Ala Leu Val Arg Ser Leu Asp  
305 310 315 320  
Ser His Met Ala Tyr Tyr Lys Arg Trp Ala Glu Thr Trp Glu Phe Gln  
325 330 335  
Ala Leu Leu Lys Ala Arg Pro Met Thr Gly Asp Ile Asp Leu Gly Gln  
340 345 350  
Ser Tyr Val Asp Ala Leu Ser Pro Leu Ile Trp Ala Ala Ser Gln Arg  
355 360 365

Glu Ser Phe Val Thr Asp Val Gln Ala Met Arg Arg Arg Val Leu Asp  
370 375 380  
Asn Val Pro Glu Asp Leu Arg Asp Arg Glu Leu Lys Leu Gly Arg Gly  
385 390 395 400  
Gly Leu Arg Asp Val Glu Phe Ala Val Gln Leu Leu Gln Met Val His  
405 410 415  
Gly Arg Ile Asp Glu Thr Leu Arg Val Arg Ser Thr Val Asn Ala Leu  
420 425 430  
His Val Leu Val Asp Gln Gly Tyr Val Gly Arg Glu Asp Gly His Asn  
435 440 445  
Leu Ile Glu Ser Tyr Glu Phe Leu Arg Leu Leu Glu His Arg Leu Gln  
450 455 460  
Leu Glu Arg Ile Lys Arg Thr His Leu Leu Pro Lys Pro Asp Asp Arg  
465 470 475 480  
Met Asn Met Arg Trp Leu Ala Arg Ala Ser Gly Phe Thr Gly Ser Met  
485 490 495  
Glu Gln Ser Ser Ala Lys Ala Met Glu Arg His Leu Arg Lys Val Arg  
500 505 510  
Leu Gln Ile Gln Ser Leu His Ser Gln Leu Phe Tyr Arg Pro Leu Leu  
515 520 525  
Asn Ser Val Val Asn Leu Ser Ala Asp Ala Ile Arg Leu Ser Pro Asp  
530 535 540  
Ala Ala Lys Leu Gln Leu Gly Ala Leu Gly Tyr Leu His Pro Ser Arg  
545 550 555 560  
Ala Tyr Glu His Leu Thr Ala Leu Ala Ser Gly Ala Ser Arg Lys Ala  
565 570 575  
Lys Ile Gln Ala Met Leu Leu Pro Thr Leu Met Glu Trp Leu Ser Gln  
580 585 590  
Thr Ala Glu Pro Asp Ala Gly Leu Leu Asn Tyr Arg Lys Leu Ser Asp

595 600 605  
Ala Ser Tyr Asp Arg Ser Trp Phe Leu Arg Met Leu Arg Asp Glu Gly  
610 615 620  
Val Val Gly Gln Arg Leu Met Arg Ile Leu Gly Asn Ser Pro Tyr Ile  
625 630 635 640  
Ser Glu Leu Ile Ile Ser Thr Pro Asp Phe Val Lys Gln Leu Gly Asp  
645 650 655  
Ala Ala Ser Gly Pro Lys Leu Leu Ala Thr Ala Pro Thr Gln Val Val  
660 665 670  
Lys Ala Ile Lys Ala Thr Val Ser Arg His Glu Ser Pro Asp Arg Ala  
675 680 685  
Ile Gln Ala Ala Arg Ser Leu Arg Arg Gln Glu Leu Ala Arg Ile Ala  
690 695 700  
Ser Ala Asp Leu Leu Asn Met Leu Thr Val Gln Glu Val Cys Gln Ser  
705 710 715 720  
Leu Ser Leu Val Trp Asp Ala Val Leu Asp Ala Ala Leu Asp Ala Glu  
725 730 735  
Ile Arg Ala Ala Leu Asn Asp Pro Gln Lys Pro Asp Gln Pro Leu Ala  
740 745 750  
Asn Ile Ser Val Ile Gly Met Gly Arg Leu Gly Gly Ala Glu Leu Gly  
755 760 765  
Tyr Gly Ser Asp Ala Asp Val Met Phe Val Cys Glu Pro Val Ala Gly  
770 775 780  
Val Glu Glu His Glu Ala Val Thr Trp Ser Ile Ala Ile Cys Asp Ser  
785 790 795 800  
Met Arg Ser Arg Leu Ala Gln Pro Ser Gly Asp Pro Pro Leu Glu Val  
805 810 815  
Asp Leu Gly Leu Arg Pro Glu Gly Arg Ser Gly Ala Ile Val Arg Thr  
820 825 830



Val Asp Ser Tyr Val Lys Tyr Tyr Glu Lys Trp Gly Glu Thr Trp Glu  
 835 840 845  
 Ile Gln Ala Leu Leu Arg Ala Ala Trp Val Ala Gly Asp Arg Glu Leu  
 850 855 860  
 Gly Ile Lys Phe Leu Glu Ser Ile Asp Arg Phe Arg Tyr Pro Val Asp  
 865 870 875 880  
 Gly Ala Thr Gln Ala Gln Leu Arg Glu Val Arg Arg Ile Lys Ala Arg  
 885 890 895  
 Val Asp Asn Glu Arg Leu Pro Arg Gly Ala Asp Arg Asn Thr His Thr  
 900 905 910  
 Lys Leu Gly Arg Gly Ala Leu Thr Asp Ile Glu Trp Thr Val Gln Leu  
 915 920 925  
 Leu Thr Met Met His Ala His Glu Ile Pro Glu Leu His Asn Thr Ser  
 930 935 940  
 Thr Leu Glu Val Leu Glu Val Leu Glu Lys His Gln Ile Ile Asn Pro  
 945 950 955 960  
 Val Gln Val Gln Thr Leu Arg Glu Ala Trp Leu Thr Ala Thr Ala Ala  
 965 970 975  
 Arg Asn Ala Leu Val Leu Val Arg Gly Lys Arg Leu Asp Gln Leu Pro  
 980 985 990  
 Thr Pro Gly Pro His Leu Ala Gln Val Ala Gly Ala Ser Gly Trp Asp  
 995 1000 1005  
 Pro Asn Glu Tyr Gln Glu Tyr Leu Glu Asn Tyr Leu Lys Val Thr Arg  
 1010 1015 1020  
 Lys Ser Arg Gln Val Val Asp Glu Val Phe Trp Gly Val Asp Ser Met  
 1025 1030 1035 1040  
 Glu Gln Arg Glu Phe  
 1045

&lt;210&gt; 19

&lt;211&gt; 1434

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Brevibacterium lactofermentum

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1)..(1434)

&lt;400&gt; 19

```

gtg gcg ttt gaa acc ccg gaa gaa att gtc aag ttc atc aag gat gaa 48
Val Ala Phe Glu Thr Pro Glu Glu Ile Val Lys Phe Ile Lys Asp Glu
  1           5           10          15
aac gtc gag ttc gtt gac gtt cga ttc acc gac ctt ccc ggc acc gag 96
Asn Val Glu Phe Val Asp Val Arg Phe Thr Asp Leu Pro Gly Thr Glu
          20           25           30
cag cac ttc agc atc cca gct gcc agc ttc gat gca gat aca gtc gaa 144
Gln His Phe Ser Ile Pro Ala Ala Ser Phe Asp Ala Asp Thr Val Glu
          35           40           45
gaa ggt ctc gca ttc gac gga tcc tcg atc cgt ggc ttc acc acg atc 192
Glu Gly Leu Ala Phe Asp Gly Ser Ser Ile Arg Gly Phe Thr Thr Ile
          50           55           60
gac gaa tct gac atg aat ctc ctg cca gac ctc gga acg gcc acc ctt 240
Asp Glu Ser Asp Met Asn Leu Leu Pro Asp Leu Gly Thr Ala Thr Leu
          65           70           75           80
gat cca ttc cgc aag gca aag acc ctg aac gtt aag ttc ttc gtt cac 288
Asp Pro Phe Arg Lys Ala Lys Thr Leu Asn Val Lys Phe Phe Val His
          85           90           95
gat cct ttc acc cgc gag gca ttc tcc cgc gac cca cgc aac gta gca 336

```

Asp Pro Phe Thr Arg Glu Ala Phe Ser Arg Asp Pro Arg Asn Val Ala	
100	105
110	
cgc aag gca gag cag tac ctg gca tcc acc ggc att gca gac acc tgc	384
Arg Lys Ala Glu Gln Tyr Leu Ala Ser Thr Gly Ile Ala Asp Thr Cys	
115	120
125	
aac ttc ggc gcc gag gct gag ttc tac ctc ttc gac tcc gtt cgc tac	432
Asn Phe Gly Ala Glu Ala Glu Phe Tyr Leu Phe Asp Ser Val Arg Tyr	
130	135
140	
tcc acc gag atg aac tcc ggc ttc tac gaa gta gat acc gaa gaa ggc	480
Ser Thr Glu Met Asn Ser Gly Phe Tyr Glu Val Asp Thr Glu Glu Gly	
145	150
155	160
tgg tgg aac cgt ggc aag gaa acc aac ctc gac gga acc cca aac ctg	528
Trp Trp Asn Arg Gly Lys Glu Thr Asn Leu Asp Gly Thr Pro Asn Leu	
165	170
175	
ggc gca aag aac cgc gtc aag ggt ggc tac ttc cca gta gca cca tac	576
Gly Ala Lys Asn Arg Val Lys Gly Gly Tyr Phe Pro Val Ala Pro Tyr	
180	185
190	
gac caa acc gtt gac gtg cgc gat gac atg gtt cgc aac ctc gca gct	624
Asp Gln Thr Val Asp Val Arg Asp Asp Met Val Arg Asn Leu Ala Ala	
195	200
205	
tcc ggc ttc gct ctt gag cgt ttc cac cac gaa gtc ggt ggc gga cag	672
Ser Gly Phe Ala Leu Glu Arg Phe His His Glu Val Gly Gly Gly Gln	
210	215
220	
cag gaa atc aac tac cgc ttc aac acc atg ctc cac gcg gca gat gat	720
Gln Glu Ile Asn Tyr Arg Phe Asn Thr Met Leu His Ala Ala Asp Asp	
225	230
235	240
atc cag acc ttc aag tac atc atc aag aac acc gct cgc ctc cac ggc	768
Ile Gln Thr Phe Lys Tyr Ile Ile Lys Asn Thr Ala Arg Leu His Gly	
245	250
255	

aag gct gca acc ttc atg cct aag cca ctg gct ggc gac aac ggt tcc 816  
Lys Ala Ala Thr Phe Met Pro Lys Pro Leu Ala Gly Asp Asn Gly Ser  
260 265 270  
ggc atg cac gct cac cag tcc ctc tgg aag gac ggc aag cca ctc ttc 864  
Gly Met His Ala His Gln Ser Leu Trp Lys Asp Gly Lys Pro Leu Phe  
275 280 285  
cac gat gag tcc ggc tac gca ggc ctg tcc gac atc gcc cgc tac tac 912  
His Asp Glu Ser Gly Tyr Ala Gly Leu Ser Asp Ile Ala Arg Tyr Tyr  
290 295 300  
atc ggc ggc atc ctg cac cac gca ggc gct gtt ctg gcg ttc acc aac 960  
Ile Gly Gly Ile Leu His His Ala Gly Ala Val Leu Ala Phe Thr Asn  
305 310 315 320  
gca acc ctg aac tcc tac cac cgt ctg gtt cca ggc ttc gag gct cca 1008  
Ala Thr Leu Asn Ser Tyr His Arg Leu Val Pro Gly Phe Glu Ala Pro  
325 330 335  
atc aac ctg gtg tac tca cag cgc aac cgt tcc gct gct gtc cgt atc 1056  
Ile Asn Leu Val Tyr Ser Gln Arg Asn Arg Ser Ala Ala Val Arg Ile  
340 345 350  
cca atc acc gga tcc aac cca aag gca aag cgc atc gaa ttc cgc gct 1104  
Pro Ile Thr Gly Ser Asn Pro Lys Ala Lys Arg Ile Glu Phe Arg Ala  
355 360 365  
cca gac cca tca ggc aac cca tac ctg ggc ttc gca gcg atg atg atg 1152  
Pro Asp Pro Ser Gly Asn Pro Tyr Leu Gly Phe Ala Ala Met Met Met  
370 375 380  
gcc ggc ctc gac ggc atc aag aac cgc atc gag cca cac gct cca gtg 1200  
Ala Gly Leu Asp Gly Ile Lys Asn Arg Ile Glu Pro His Ala Pro Val  
385 390 395 400  
gac aag gac ctc tac gaa ctg cca cca gag gaa gct gca tcc att cca 1248  
Asp Lys Asp Leu Tyr Glu Leu Pro Pro Glu Glu Ala Ala Ser Ile Pro

405	410	415	
cag gca cca acc tcc ctg gaa gca tcc ctg aag gca ctg cag gaa gac			1296
Gln Ala Pro Thr Ser Leu Glu Ala Ser Leu Lys Ala Leu Gln Glu Asp			
420	425	430	
acc gac ttc ctc acc gag tct gac gtc ttc acc gag gat ctc atc gag			1344
Thr Asp Phe Leu Thr Glu Ser Asp Val Phe Thr Glu Asp Leu Ile Glu			
435	440	445	
gcg tac atc cag tac aag tac gac aac gag atc tcc cca gtt cgc ctg			1392
Ala Tyr Ile Gln Tyr Lys Tyr Asp Asn Glu Ile Ser Pro Val Arg Leu			
450	455	460	
cgc cca acc ccg cag gaa ttc gaa ttg tac ttc gac tgc taa			1434
Arg Pro Thr Pro Gln Glu Phe Glu Leu Tyr Phe Asp Cys			
465	470	475	

&lt;210&gt; 20

&lt;211&gt; 477

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Brevibacterium lactofermentum

&lt;400&gt; 20

Val Ala Phe Glu Thr Pro Glu Glu Ile Val Lys Phe Ile Lys Asp Glu			
1	5	10	15
Asn Val Glu Phe Val Asp Val Arg Phe Thr Asp Leu Pro Gly Thr Glu			
20	25	30	
Gln His Phe Ser Ile Pro Ala Ala Ser Phe Asp Ala Asp Thr Val Glu			
35	40	45	
Glu Gly Leu Ala Phe Asp Gly Ser Ser Ile Arg Gly Phe Thr Thr Ile			
50	55	60	
Asp Glu Ser Asp Met Asn Leu Leu Pro Asp Leu Gly Thr Ala Thr Leu			

出証特 2 0 0 3 - 3 1 0 9 9 3 2

Ile Gly Gly Ile Leu His His Ala Gly Ala Val Leu Ala Phe Thr Asn  
305 310 315 320  
Ala Thr Leu Asn Ser Tyr His Arg Leu Val Pro Gly Phe Glu Ala Pro  
325 330 335  
Ile Asn Leu Val Tyr Ser Gln Arg Asn Arg Ser Ala Ala Val Arg Ile  
340 345 350  
Pro Ile Thr Gly Ser Asn Pro Lys Ala Lys Arg Ile Glu Phe Arg Ala  
355 360 365  
Pro Asp Pro Ser Gly Asn Pro Tyr Leu Gly Phe Ala Ala Met Met Met  
370 375 380  
Ala Gly Leu Asp Gly Ile Lys Asn Arg Ile Glu Pro His Ala Pro Val  
385 390 395 400  
Asp Lys Asp Leu Tyr Glu Leu Pro Pro Glu Glu Ala Ala Ser Ile Pro  
405 410 415  
Gln Ala Pro Thr Ser Leu Glu Ala Ser Leu Lys Ala Leu Gln Glu Asp  
420 425 430  
Thr Asp Phe Leu Thr Glu Ser Asp Val Phe Thr Glu Asp Leu Ile Glu  
435 440 445  
Ala Tyr Ile Gln Tyr Lys Tyr Asp Asn Glu Ile Ser Pro Val Arg Leu  
450 455 460  
Arg Pro Thr Pro Gln Glu Phe Glu Leu Tyr Phe Asp Cys  
465 470 475

&lt;210&gt; 21

&lt;211&gt; 672

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Brevibacterium lactofermentum

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1).. (669)

&lt;400&gt; 21

```

atg gca gga gca gtg gga cgc ccc cgg aga tca gct ccg cga cgg gca 48
Met Ala Gly Ala Val Gly Arg Pro Arg Arg Ser Ala Pro Arg Arg Ala
   1             5             10            15
ggc aag aat cct cgc gag gag att ctt gac gcc tct gct gag ctt ttc 96
Gly Lys Asn Pro Arg Glu Glu Ile Leu Asp Ala Ser Ala Glu Leu Phe
           20           25           30
acc cat caa ggc ttc gca aca acc tcc acg cat caa atc gct gat gcc 144
Thr His Gln Gly Phe Ala Thr Thr Ser Thr His Gln Ile Ala Asp Ala
           35           40           45
gtg gga atc cgc caa gcc tcg ctg tat tat cac ttc ccg tct aag acg 192
Val Gly Ile Arg Gln Ala Ser Leu Tyr Tyr His Phe Pro Ser Lys Thr
           50           55           60
gaa atc ttc ctc acc ctc ctg aaa tct acc gtc gag ccg tcc act gtg 240
Glu Ile Phe Leu Thr Leu Leu Lys Ser Thr Val Glu Pro Ser Thr Val
           65           70           75           80
ctc gcc gaa gac tta agc atc ctg gat gca gga cct gag atg cgc ctc 288
Leu Ala Glu Asp Leu Ser Ile Leu Asp Ala Gly Pro Glu Met Arg Leu
           85           90           95
tgg gca atc gtt gcc tcc gaa gtg cgt ctg ctg ctg tcc acc aag tgg 336
Trp Ala Ile Val Ala Ser Glu Val Arg Leu Leu Leu Ser Thr Lys Trp
           100          105          110
aac gtc ggt cgc ctg tac caa ctc ccc atc gtt ggt tct gaa gag ttc 384
Asn Val Gly Arg Leu Tyr Gln Leu Pro Ile Val Gly Ser Glu Glu Phe
           115          120          125
gcc gag tac cac agc cag cgc gaa gcc ctc acc aac atc ttc cgc gac 432

```



Ala Glu Tyr His Ser Gln Arg Glu Ala Leu Thr Asn Ile Phe Arg Asp  
 130 135 140  
 ctc gcc acc gaa atc gtc ggt gac gac ccc cgc gca gaa ctc ccc ttc 480  
 Leu Ala Thr Glu Ile Val Gly Asp Asp Pro Arg Ala Glu Leu Pro Phe  
 145 150 155 160  
 cac atc acc atg tcg gtg atc gaa atg cgt cgc aac gac ggc aag att 528  
 His Ile Thr Met Ser Val Ile Glu Met Arg Arg Asn Asp Gly Lys Ile  
 165 170 175  
 cca agc ccg ctt tcc gca gac agc ctc ccg gag acc gca att atg ctt 576  
 Pro Ser Pro Leu Ser Ala Asp Ser Leu Pro Glu Thr Ala Ile Met Leu  
 180 185 190  
 gcc gac gcc tcc ctc gcc gtc ctc ggc gcg tcg ctg ccc gcc gac cgg 624  
 Ala Asp Ala Ser Leu Ala Val Leu Gly Ala Ser Leu Pro Ala Asp Arg  
 195 200 205  
 gtc gaa aaa acg ctt gaa cta atc aag cag gct gac gcg aaa taa cca 672  
 Val Glu Lys Thr Leu Glu Leu Ile Lys Gln Ala Asp Ala Lys  
 210 215 220

&lt;210&gt; 22

&lt;211&gt; 222

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Brevibacterium lactofermentum

&lt;400&gt; 22

Met Ala Gly Ala Val Gly Arg Pro Arg Arg Ser Ala Pro Arg Arg Ala  
 1 5 10 15  
 Gly Lys Asn Pro Arg Glu Glu Ile Leu Asp Ala Ser Ala Glu Leu Phe  
 20 25 30  
 Thr His Gln Gly Phe Ala Thr Thr Ser Thr His Gln Ile Ala Asp Ala

35 40 45  
Val Gly Ile Arg Gln Ala Ser Leu Tyr Tyr His Phe Pro Ser Lys Thr  
50 55 60  
Glu Ile Phe Leu Thr Leu Leu Lys Ser Thr Val Glu Pro Ser Thr Val  
65 70 75 80  
Leu Ala Glu Asp Leu Ser Ile Leu Asp Ala Gly Pro Glu Met Arg Leu  
85 90 95  
Trp Ala Ile Val Ala Ser Glu Val Arg Leu Leu Leu Ser Thr Lys Trp  
100 105 110  
Asn Val Gly Arg Leu Tyr Gln Leu Pro Ile Val Gly Ser Glu Glu Phe  
115 120 125  
Ala Glu Tyr His Ser Gln Arg Glu Ala Leu Thr Asn Ile Phe Arg Asp  
130 135 140  
Leu Ala Thr Glu Ile Val Gly Asp Asp Pro Arg Ala Glu Leu Pro Phe  
145 150 155 160  
His Ile Thr Met Ser Val Ile Glu Met Arg Arg Asn Asp Gly Lys Ile  
165 170 175  
Pro Ser Pro Leu Ser Ala Asp Ser Leu Pro Glu Thr Ala Ile Met Leu  
180 185 190  
Ala Asp Ala Ser Leu Ala Val Leu Gly Ala Ser Leu Pro Ala Asp Arg  
195 200 205  
Val Glu Lys Thr Leu Glu Leu Ile Lys Gln Ala Asp Ala Lys  
210 215 220

&lt;210&gt; 23

&lt;211&gt; 2076

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Brevibacterium lactofermentum

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1)..(2076)

&lt;400&gt; 23

```

atg aat aat cca gcc cag ctg cgc caa gat act gaa aag gaa gtc ctg 48
Met Asn Asn Pro Ala Gln Leu Arg Gln Asp Thr Glu Lys Glu Val Leu
  1           5           10          15
gcg ttg ctg ggc tct ttg gtt tta ccc gcc ggc acc gcg ctt gcc gcc 96
Ala Leu Leu Gly Ser Leu Val Leu Pro Ala Gly Thr Ala Leu Ala Ala
          20           25           30
acc gga tct ttg gcc agg tcc gaa ctc acg ccg tat tcc gat ttg gac 144
Thr Gly Ser Leu Ala Arg Ser Glu Leu Thr Pro Tyr Ser Asp Leu Asp
          35           40           45
ctc att ttg atc cat cca cca ggg gca acc ccg gat ggc gtg gag gat 192
Leu Ile Leu Ile His Pro Pro Gly Ala Thr Pro Asp Gly Val Glu Asp
          50           55           60
ttg tgg tac ccg att tgg gac gca aaa aag cgc ctc gac tac tcc gtg 240
Leu Trp Tyr Pro Ile Trp Asp Ala Lys Lys Arg Leu Asp Tyr Ser Val
          65           70           75           80
cgc acc cca gat gag tgc gtg gct atg att tct gcg gat tcc act gca 288
Arg Thr Pro Asp Glu Cys Val Ala Met Ile Ser Ala Asp Ser Thr Ala
          85           90           95
gcc ctt gcc atg ctt gac ctg cga ttt att gct ggc gat gag gat ctg 336
Ala Leu Ala Met Leu Asp Leu Arg Phe Ile Ala Gly Asp Glu Asp Leu
          100          105          110
tgt gcc aaa acg cgc cgg cgc atc gtg gag aag tgg cgc cag gaa ctc 384
Cys Ala Lys Thr Arg Arg Arg Ile Val Glu Lys Trp Arg Gln Glu Leu
          115          120          125

```

aac aaa aac ttc gac gcc gtt gtg gac acc gcg att gcc cgt tgg cgc 432  
 Asn Lys Asn Phe Asp Ala Val Val Asp Thr Ala Ile Ala Arg Trp Arg  
 130 135 140  
 cgc tcc gga ccc gtc gtg gca atg acg cgg cca gat ctt aaa cac gcc 480  
 Arg Ser Gly Pro Val Val Ala Met Thr Arg Pro Asp Leu Lys His Gly  
 145 150 155 160  
 agg gga ggg ctg cgc gat ttc gaa ctg atc aag gcc ctc gcg ctc gcc 528  
 Arg Gly Gly Leu Arg Asp Phe Glu Leu Ile Lys Ala Leu Ala Leu Gly  
 165 170 175  
 cac cta tgc aac gtt cca cag cta gat acg caa cac cag ctg ctt ctc 576  
 His Leu Cys Asn Val Pro Gln Leu Asp Thr Gln His Gln Leu Leu Leu  
 180 185 190  
 gac gcc cgc acc ttg ctg cac gtc cac gcg cga cgc tcc cgc gac gtc 624  
 Asp Ala Arg Thr Leu Leu His Val His Ala Arg Arg Ser Arg Asp Val  
 195 200 205  
 ctt gat ccc gaa ttt gcg gtg gat gtg gcc atg gat ttg ggc ttt gtt 672  
 Leu Asp Pro Glu Phe Ala Val Asp Val Ala Met Asp Leu Gly Phe Val  
 210 215 220  
 gac cgc tat cac tta ggc cgg gag atc gcc gat gca gcc cgc gcc att 720  
 Asp Arg Tyr His Leu Gly Arg Glu Ile Ala Asp Ala Ala Arg Ala Ile  
 225 230 235 240  
 gat gac ggc ctg acc acc gcg ctg gcc acc gcc cgt ggc att ttg cca 768  
 Asp Asp Gly Leu Thr Thr Ala Leu Ala Thr Ala Arg Gly Ile Leu Pro  
 245 250 255  
 cgt cgc acg ggt ttt gct ttt agg aat gct tct cga cgc cca ctt gat 816  
 Arg Arg Thr Gly Phe Ala Phe Arg Asn Ala Ser Arg Arg Pro Leu Asp  
 260 265 270  
 ctt gat gtc gtc gac gcc aac ggc act atc gaa ttg tcc aaa aaa cca 864  
 Leu Asp Val Val Asp Ala Asn Gly Thr Ile Glu Leu Ser Lys Lys Pro

275	280	285	
gat ctt aat gat ccc gca ctt cca ctt cga gtg gcc gca gcc gca gcg			912
Asp Leu Asn Asp Pro Ala Leu Pro Leu Arg Val Ala Ala Ala Ala Ala			
290	295	300	
acc acc gga ctt ccg gtg gca gaa tca acc tgg gct cga ctt aat gaa			960
Thr Thr Gly Leu Pro Val Ala Glu Ser Thr Trp Ala Arg Leu Asn Glu			
305	310	315	320
tgc ccg cca ctt cct gag cca tgg cct gcc aat gca gca ggg gac ttc			1008
Cys Pro Pro Leu Pro Glu Pro Trp Pro Ala Asn Ala Ala Gly Asp Phe			
325	330	335	
ttt cgg att ctc tcc agt ccg aaa aac tca cgc cga gtg gtg aaa aat			1056
Phe Arg Ile Leu Ser Ser Pro Lys Asn Ser Arg Arg Val Val Lys Asn			
340	345	350	
atg gat cgc cac gga ttg tgg tcg cgt ttt gtt cca gaa tgg gac cgc			1104
Met Asp Arg His Gly Leu Trp Ser Arg Phe Val Pro Glu Trp Asp Arg			
355	360	365	
atc aaa ggg ctt atg ccc cgt gaa ccc agc cat att tcc acc atc gat			1152
Ile Lys Gly Leu Met Pro Arg Glu Pro Ser His Ile Ser Thr Ile Asp			
370	375	380	
gaa cat agt ctg aac act gtt gca gga tgt gcg cta gaa act gtg acc			1200
Glu His Ser Leu Asn Thr Val Ala Gly Cys Ala Leu Glu Thr Val Thr			
385	390	395	400
gtc gcg cgc ccc gat ctt tta gtt ttg gga gcc ttg tac cac gac att			1248
Val Ala Arg Pro Asp Leu Leu Val Leu Gly Ala Leu Tyr His Asp Ile			
405	410	415	
ggc aag ggc ttc ccg cgt cca cac gaa caa gta ggt gca gag atg gtg			1296
Gly Lys Gly Phe Pro Arg Pro His Glu Gln Val Gly Ala Glu Met Val			
420	425	430	
gcg agg gcc gcg agc cgc atg ggg ttg aac ctt cgc gat cgt gcc agc			1344

Ala Arg Ala Ala Ser Arg Met Gly Leu Asn Leu Arg Asp Arg Ala Ser  
 435 440 445  
 gtg caa acg ctg gtc gcc gag cac acc gcg gtg gcc aaa atc gcc gcg 1392  
 Val Gln Thr Leu Val Ala Glu His Thr Ala Val Ala Lys Ile Ala Ala  
 450 455 460  
 cgc ctt gat ccc tcc tcg gag ggc gcc gtc gat aag ctg ctt gat gct 1440  
 Arg Leu Asp Pro Ser Ser Glu Gly Ala Val Asp Lys Leu Leu Asp Ala  
 465 470 475 480  
 gtt agg tat gac ctg gtg aca ttg aat ctg ctt gag gtg cta aca gaa 1488  
 Val Arg Tyr Asp Leu Val Thr Leu Asn Leu Leu Glu Val Leu Thr Glu  
 485 490 495  
 gct gat gcg aaa gcc acg ggg cct ggc gta tgg acg gcg cgt ttg gag 1536  
 Ala Asp Ala Lys Ala Thr Gly Pro Gly Val Trp Thr Ala Arg Leu Glu  
 500 505 510  
 cat gcg ctg cgg att gtg tgc aag cgt gcg cgt gat cgc ctc acc gat 1584  
 His Ala Leu Arg Ile Val Cys Lys Arg Ala Arg Asp Arg Leu Thr Asp  
 515 520 525  
 att cgc ccg gtt gcg ccg atg att gcg ccg cgt agc gaa att ggt ttg 1632  
 Ile Arg Pro Val Ala Pro Met Ile Ala Pro Arg Ser Glu Ile Gly Leu  
 530 535 540  
 gtg gaa cgc gat ggc gtg ttc aca gtg caa tgg cac ggc gaa gac tta 1680  
 Val Glu Arg Asp Gly Val Phe Thr Val Gln Trp His Gly Glu Asp Leu  
 545 550 555 560  
 cat cgg att ctt ggc gta att tat gcc aaa gga tgg aca atc acc gcg 1728  
 His Arg Ile Leu Gly Val Ile Tyr Ala Lys Gly Trp Thr Ile Thr Ala  
 565 570 575  
 gcg cgc atg ctg gcc aat ggt caa tgg agt gcg gaa ttt gat gtc cgc 1776  
 Ala Arg Met Leu Ala Asn Gly Gln Trp Ser Ala Glu Phe Asp Val Arg  
 580 585 590

gca aac ggc ccc caa gat ttt gat ccg cag cat ttc ctg cag gca tat 1824  
Ala Asn Gly Pro Gln Asp Phe Asp Pro Gln His Phe Leu Gln Ala Tyr  
595 600 605

caa tcc ggt gtg ttt tcc gag gtt ccc att cca gca cct ggg ata aca 1872  
Gln Ser Gly Val Phe Ser Glu Val Pro Ile Pro Ala Pro Gly Ile Thr  
610 615 620

gcc aca ttt tgg cac ggg aac act tta gaa gtg cgc act gag ctt cgc 1920  
Ala Thr Phe Trp His Gly Asn Thr Leu Glu Val Arg Thr Glu Leu Arg  
625 630 635 640

aca gga gct att ttt gcc ctg ctc aga aca ttg ccc gat gcc ctc tgg 1968  
Thr Gly Ala Ile Phe Ala Leu Leu Arg Thr Leu Pro Asp Ala Leu Trp  
645 650 655

atc aac gct gtg acc cgc ggt gcg acc ctg att atc cag gca gca ctg 2016  
Ile Asn Ala Val Thr Arg Gly Ala Thr Leu Ile Ile Gln Ala Ala Leu  
660 665 670

aag ccc ggc ttc gat cga gca acg gtg gaa cgc tcc gta gtc agg tcg 2064  
Lys Pro Gly Phe Asp Arg Ala Thr Val Glu Arg Ser Val Val Arg Ser  
675 680 685

ttg gca ggt agc 2076  
Leu Ala Gly Ser  
690

&lt;210&gt; 24

&lt;211&gt; 692

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Brevibacterium lactofermentum

&lt;400&gt; 24

Met Asn Asn Pro Ala Gln Leu Arg Gln Asp Thr Glu Lys Glu Val Leu

1	5	10	15
Ala	Leu	Leu	Gly
Ser	Leu	Val	Leu
Pro	Ala	Gly	Thr
Ala	Leu	Ala	Ala
20	25	30	
Thr	Gly	Ser	Leu
Ala	Arg	Ser	Glu
Leu	Thr	Pro	Tyr
Ser	Asp	Leu	Asp
35	40	45	
Leu	Ile	Leu	Ile
His	Pro	Pro	Gly
Ala	Thr	Pro	Asp
Gly	Val	Glu	Asp
50	55	60	
Leu	Trp	Tyr	Pro
Ile	Trp	Asp	Ala
Lys	Lys	Arg	Leu
Asp	Tyr	Ser	Val
65	70	75	80
Arg	Thr	Pro	Asp
Glu	Cys	Val	Ala
Met	Ile	Ser	Ala
Asp	Ser	Thr	Ala
85	90	95	
Ala	Leu	Ala	Met
Leu	Asp	Leu	Arg
Phe	Ile	Ala	Gly
Asp	Glu	Asp	Leu
100	105	110	
Cys	Ala	Lys	Thr
Arg	Arg	Arg	Ile
Val	Glu	Lys	Trp
Arg	Gln	Glu	Leu
115	120	125	
Asn	Lys	Asn	Phe
Asp	Ala	Val	Val
Asp	Thr	Ala	Ile
Ala	Arg	Trp	Arg
130	135	140	
Arg	Ser	Gly	Pro
Val	Val	Ala	Met
Thr	Arg	Pro	Asp
Leu	Lys	His	Gly
145	150	155	160
Arg	Gly	Gly	Leu
Arg	Asp	Phe	Glu
Leu	Ile	Lys	Ala
Leu	Ala	Leu	Gly
165	170	175	
His	Leu	Cys	Asn
Val	Pro	Gln	Leu
Asp	Thr	Gln	His
Gln	Leu	Leu	Leu
180	185	190	
Asp	Ala	Arg	Thr
Leu	Leu	His	Val
His	Ala	Arg	Arg
Ser	Arg	Asp	Val
195	200	205	
Leu	Asp	Pro	Glu
Phe	Ala	Val	Asp
Val	Ala	Met	Asp
Leu	Gly	Phe	Val
210	215	220	
Asp	Arg	Tyr	His
Leu	Gly	Arg	Glu
Ile	Ala	Asp	Ala
Ala	Arg	Ala	Ile
225	230	235	240



Asp Asp Gly Leu Thr Thr Ala Leu Ala Thr Ala Arg Gly Ile Leu Pro			
	245	250	255
Arg Arg Thr Gly Phe Ala Phe Arg Asn Ala Ser Arg Arg Pro Leu Asp			
	260	265	270
Leu Asp Val Val Asp Ala Asn Gly Thr Ile Glu Leu Ser Lys Lys Pro			
	275	280	285
Asp Leu Asn Asp Pro Ala Leu Pro Leu Arg Val Ala Ala Ala Ala Ala			
	290	295	300
Thr Thr Gly Leu Pro Val Ala Glu Ser Thr Trp Ala Arg Leu Asn Glu			
305	310	315	320
Cys Pro Pro Leu Pro Glu Pro Trp Pro Ala Asn Ala Ala Gly Asp Phe			
	325	330	335
Phe Arg Ile Leu Ser Ser Pro Lys Asn Ser Arg Arg Val Val Lys Asn			
	340	345	350
Met Asp Arg His Gly Leu Trp Ser Arg Phe Val Pro Glu Trp Asp Arg			
	355	360	365
Ile Lys Gly Leu Met Pro Arg Glu Pro Ser His Ile Ser Thr Ile Asp			
	370	375	380
Glu His Ser Leu Asn Thr Val Ala Gly Cys Ala Leu Glu Thr Val Thr			
385	390	395	400
Val Ala Arg Pro Asp Leu Leu Val Leu Gly Ala Leu Tyr His Asp Ile			
	405	410	415
Gly Lys Gly Phe Pro Arg Pro His Glu Gln Val Gly Ala Glu Met Val			
	420	425	430
Ala Arg Ala Ala Ser Arg Met Gly Leu Asn Leu Arg Asp Arg Ala Ser			
	435	440	445
Val Gln Thr Leu Val Ala Glu His Thr Ala Val Ala Lys Ile Ala Ala			
	450	455	460
Arg Leu Asp Pro Ser Ser Glu Gly Ala Val Asp Lys Leu Leu Asp Ala			

465                      470                      475                      480  
Val Arg Tyr Asp Leu Val Thr Leu Asn Leu Leu Glu Val Leu Thr Glu  
                         485                      490                      495  
Ala Asp Ala Lys Ala Thr Gly Pro Gly Val Trp Thr Ala Arg Leu Glu  
                         500                      505                      510  
His Ala Leu Arg Ile Val Cys Lys Arg Ala Arg Asp Arg Leu Thr Asp  
                         515                      520                      525  
Ile Arg Pro Val Ala Pro Met Ile Ala Pro Arg Ser Glu Ile Gly Leu  
                         530                      535                      540  
Val Glu Arg Asp Gly Val Phe Thr Val Gln Trp His Gly Glu Asp Leu  
545                      550                      555                      560  
His Arg Ile Leu Gly Val Ile Tyr Ala Lys Gly Trp Thr Ile Thr Ala  
                         565                      570                      575  
Ala Arg Met Leu Ala Asn Gly Gln Trp Ser Ala Glu Phe Asp Val Arg  
                         580                      585                      590  
Ala Asn Gly Pro Gln Asp Phe Asp Pro Gln His Phe Leu Gln Ala Tyr  
                         595                      600                      605  
Gln Ser Gly Val Phe Ser Glu Val Pro Ile Pro Ala Pro Gly Ile Thr  
                         610                      615                      620  
Ala Thr Phe Trp His Gly Asn Thr Leu Glu Val Arg Thr Glu Leu Arg  
625                      630                      635                      640  
Thr Gly Ala Ile Phe Ala Leu Leu Arg Thr Leu Pro Asp Ala Leu Trp  
                         645                      650                      655  
Ile Asn Ala Val Thr Arg Gly Ala Thr Leu Ile Ile Gln Ala Ala Leu  
                         660                      665                      670  
Lys Pro Gly Phe Asp Arg Ala Thr Val Glu Arg Ser Val Val Arg Ser  
                         675                      680                      685  
Leu Ala Gly Ser  
690

【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 コリネ型細菌を用いたL-アルギニン、L-リジンの生産において、生産性を向上させ、L-アルギニン、L-リジン蓄積を向上させる。

【解決手段】 L-アルギニン又はL-リジン生産能を有し、かつ、細胞内のグルタミンシンテターゼ活性が増強されるように改変されたコリネ型細菌、例えばグルタミンシンテターゼのアデニル化による活性調節が解除されるように改変されたコリネ型細菌を培地に培養し、該培地中にL-アルギニン又はL-リジンを生成蓄積させ、同培地からL-アルギニン又はL-リジンを採取することにより、L-アルギニン又はL-リジンを製造する。

【選択図】 なし

特願 2 0 0 3 - 0 5 6 1 2 9

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[ 0 0 0 0 0 0 0 6 6 ]

1. 変更年月日

1 9 9 1 年 7 月 2 日

[変更理由]

住所変更

住 所

東京都中央区京橋 1 丁目 1 5 番 1 号

氏 名

味の素株式会社